

**Molekulare Grundlage
der Glyphosatresistenz
in *Klebsiella pneumoniae* Stamm K1**

DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
der Fakultät für Biologie
der Ruhr-Universität Bochum

von

DIETRICH SOST
aus Wuppertal

Bochum 1989



**Molekulare Grundlage
der Glyphosatresistenz
in *Klebsiella pneumoniae* Stamm K1**

DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
der Fakultät für Biologie
der Ruhr-Universität Bochum

von

DIETRICH SOST
aus Wuppertal

Bochum 1989

Molekulare Grundlagen
der Glykolyse
in Kieselalgen

DISSEMINATION

zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
der Fakultät für Biologie
der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

1. Gutachter: Prof. Dr. N. Amrhein

2. Gutachter: Prof. Dr. A. Trebst

Tag der mündlichen Prüfung: 16.3.1989

Bonn 1989

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	III
I. Einleitung	1
II. Material und Methoden	5
1. Bakterienstämme, Phagen, Plasmide	5
1.1. Bakterien	5
1.2. Phagen	5
1.3. Plasmide	6
2. Chemikalien	6
2.1. Radiochemikalien	6
2.2. Fein- und Biochemikalien	6
3. Methoden	7
3.1. Bakterien- und Phagenanzucht	7
3.2. P1 Transduktion	7
3.3. DNA-Isolierung	7
3.4. DNA-Restriktion	7
3.5. Transformation	8
3.6. Agarosegelelektrophorese	8
3.7. Elution von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	8
3.8. Radioaktive Markierung von DNA	8
3.9. DNA-Transfer auf Nitrozellulose und Hybridisierung	8
3.10. Anlegen einer Genbank und Isolierung <i>aroA</i> -positiver Klone	8
3.11. Subklonierung und Expression der <i>aroA</i> -Gene	9
3.12. Bestimmung der EPSP-Synthase Aktivität	9
3.13. DNA-Sequenzierung	9
3.14. Sicherheitsmaßnahmen	10
III. Ergebnisse	11
1. Identifizierung des <i>aroA</i> -Gens in <i>Klebsiella pneumoniae</i> DNA	11
2. Anlegen von <i>K.pneumoniae</i> Genbanken in EMBL4	14
3. Identifizierung <i>aroA</i> -positiver Klone	14
4. Restriktionsanalyse	15
5. Subklonierung und Expression der <i>aroA</i> -Gene	17
6. Sequenzierung des <i>aroA</i> -Gens aus <i>K.pneumoniae</i> wt	19
7. Codongebrauch im <i>aroA</i> -Gen von <i>K.pneumoniae</i>	23
8. Die <i>aroA</i> -Gensequenz aus <i>K.pneumoniae</i> K1	24

IV. Anhang: Versuche zur Selektion Glyphosat-resistenter, haploider Pflanzen	25
1. Regeneration haploider Pflanzen aus Antheren von <i>Nicotiana</i> -Arten	26
2. Haploide Zellsuspensionskulturen von <i>N.tabacum</i>	29
3. Kultur haploider Mesophyllzellprotoplasten von <i>N.tabacum</i>	31
V. Diskussion	32
1. Identifizierung und Expression der <i>aroA</i> -Gene aus <i>Klebsiella pneumoniae</i>	33
2. Struktur des <i>aroA</i> -Gens aus <i>Klebsiella pneumoniae</i> wt	36
3. Vergleich der EPSP-Synthase Sequenz aus <i>K.pneumoniae</i> mit den bisher veröffentlichten Sequenzen	37
4. Struktur der Glyphosat-resistenten EPSP-Synthase	43
5. Allgemeine Überlegungen zu Erzeugung Glyphosat-resistenter Pflanzen	47
VI. Zusammenfassung	50
VII. Literatur	52

Abkürzungsverzeichnis

AS	Aminosäuren
bp	Basenpaare
Bq	Bequerel (Zerfälle pro Sekunde)
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EPSP	5-Enolpyruvylshikimisäure-3-Phosphat
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
kb	Kilobasen
PEP	Phosphoenolpyruvat
PSAT	3-Phosphoserin Aminotransferase
RNA	Ribonukleinsäure
S3P	Shikimisäure-3-Phosphat
SDS	Natriumdodecylsulfat
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
wt	Wildtyp
x-gal	5-Bromo-4-Chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranosid

Die Abkürzung der Basen der DNA im Einbuchstabencode sowie die Abkürzung der Aminosäuren im Einbuchstaben- bzw. Dreibuchstabencode erfolgte nach der IUPAC-Nomenklatur.

Die Abkürzung der bakteriellen Gene erfolgte nach BACHMANN & LOW (1980). Häufig verwendete Abkürzungen:

<i>aroA</i>	Gen für die EPSP-Synthase
<i>serC</i>	Gen für die PSAT
<i>hsdR</i>	Gen für die DNA-Endonuklease R aus <i>E.coli</i> K12

I. Einleitung

In Folge des wachsenden Nahrungsbedarfs hat sich in den letzten Jahrzehnten der Einsatz von Herbiziden in der modernen Landwirtschaft immer mehr durchgesetzt. Die Suche nach neuen Herbiziden konzentrierte sich dabei zunehmend auf Stoffe mit hoher Wirksamkeit verbunden mit einem minimalen Risiko für die Umwelt und dem menschlichen bzw. tierischen Organismus.

Hemmstoffe von Stoffwechselwegen, die ausschließlich bei Pflanzen und Mikroorganismen zu finden sind, eignen sich unter diesem Aspekt besonders als Herbizide, da sie potentiell unschädlich für Menschen und Tiere sind. Neben der Photosynthese, für die bereits eine Reihe von Hemmstoffen mit herbizider Wirkung bekannt sind (siehe z.B. FEDTKE, 1982), gehören die Biosynthesewege essentieller Aminosäuren zu diesen Stoffwechselwegen. So wird die Acetolactat Synthase, das Eingangsenzym der Biosynthese der verzweigtkettigen Aminosäuren Valin, Leucin und Isoleucin, spezifisch durch die Gruppe der Sulfonylharnstoffe (LEVITT et al., 1981), der Imidazolinone (SHANER et al., 1984) und der Sulfoanilide inhibiert (zusammenfassende Darstellung bei SCHLOSS et al., 1988). Auch für das zweite Enzym dieses Stoffwechselweges, die Acetolactat-Reductoisomerase, wurde vor kurzem ein Hemmstoff mit herbizider Wirkung entdeckt (SCHULZ et al., 1988).

Das wohl bekannteste Herbizid, das einen Aminosäurebiosyntheseweg inhibiert, ist das Glyphosat (N-[phosphonomethyl]glycin, Abb.1), das 1971 unter dem Handelsnamen ROUNDUP von der Monsanto Company auf den Markt gebracht wurde (BAIRD et al., 1971). Glyphosat ist toxisch für alle bisher untersuchten Pflanzen und die meisten Mikroorganismen, nicht aber für Insekten und Vertebraten (FRANZ, 1979) und zeichnet sich durch einen raschen Abbau im Boden aus (RUEPPEL et al., 1977).

1980 gelang STEINRÜCKEN & AMRHEIN die Aufklärung des Wirkmechanismus von Glyphosat. In einem bakteriellen *in vitro* System konnten sie das Enzym 5-Enolpyruvylshikimisäure-3-Phosphat (EPSP)-Synthase als molekularen Angriffsort von Glyphosat identifizieren. Die EPSP-Synthase ist das sechste Enzym des Shikimisäurewegs, über den die aromatischen Aminosäuren Phenylalanin, Tyrosin und Tryptophan gebildet werden, und katalysiert die reversible Addition eines Enolpyruvylrests von Phosphoenolpyruvat (PEP) an die 5-Hydroxylgruppe von Shikimisäure-3-Phosphat (S3P). Unter Freisetzung von anorganischem Phosphat entsteht dabei 5-Enolpyruvylshikimisäure-3-Phosphat (EPSP)(Abb.1).

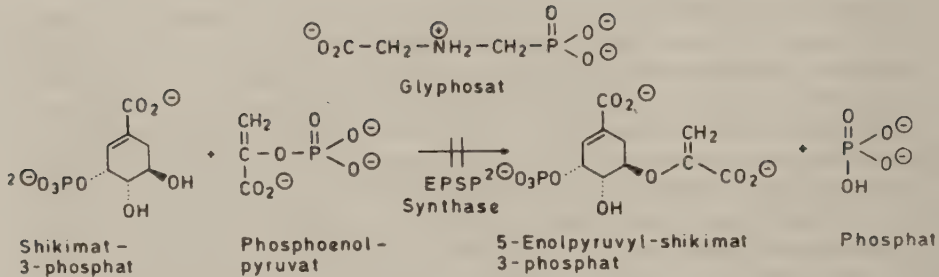


Abb.1: Reaktion der EPSP-Synthase und Struktur von Glyphosat.

Dargestellt sind die ionischen Formen bei physiologischem pH (nach AMRHEIN et al., 1987)

Glyphosat hemmt diese Reaktion kompetitiv in Bezug auf PEP und unkompetitiv in Bezug auf S3P (Literaturzusammenstellung bei AMRHEIN, 1986). Die Hemmung der EPSP-Synthase ist hochspezifisch, es werden keine weiteren PEP-umsetzenden Enzyme durch Glyphosat inhibiert (STEINRÜCKEN & AMRHEIN, 1984b). Diese Tatsache und die Beobachtung, daß Glyphosat in Bindungsexperimenten nicht mit PEP um die gleiche Bindungsstelle an der EPSP-Synthase konkurriert (KRÜPER, 1985; STEPANEK, pers. Mitteilung), machen es unwahrscheinlich, daß Glyphosat ein einfaches Struktur analogon von PEP ist. So postulierten STEINRÜCKEN & AMRHEIN (1984b) und ANTON et al. (1983), daß Glyphosat einem Übergangszustand von PEP in der EPSP-Synthase Reaktion entspricht. Diese Übergangsverbindung konnte von ANDERSON et al. (1988) isoliert werden.

Um weitere Kenntnisse über den komplexen Reaktionsmechanismus der EPSP-Synthase zu erhalten, wurden in den letzten Jahren auch die *aroA*-Gene, das sind die für die EPSP-Synthase codierenden Gene, aus verschiedenen Orga-

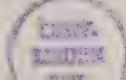
nismen kloniert und sequenziert und die Aminosäuresequenz daraus abgeleitet. Der Vergleich dieser Sequenzen erlaubt es, Rückschlüsse auf funktionell wichtige Regionen des Enzyms zu ziehen, da diese Bereiche langsameren evolutionären Veränderungen unterliegen und damit in allen Sequenzen fast identisch sein müssen.

Hilfreich für die Aufklärung des Wirkungsmechanismus von Glyphosat sind Untersuchungen an Glyphosat-resistenten Stämmen. Interessant sind dabei Resistenzen, die auf einer verminderten Affinität der Bindungsstelle, also der EPSP-Synthase, zu Glyphosat beruhen. Solche Resistenzen konnten bisher nur in Bakterien nachgewiesen werden.

Natürlich vorkommende Glyphosat-tolerante EPSP-Synthasen wurden bei Arten der Gattung *Pseudomonas* gefunden (SCHULZ et al., 1985). Die EPSP-Synthasen dieser Arten sind 50- bis 100-fach insensitiver gegenüber Glyphosat als die Enzyme anderer Bakterien. 1983 gelang es COMAI und Mitarbeitern eine Mutante von *Salmonella typhimurium* zu isolieren, die aufgrund einer Mutation im *aroA*-Gen eine Glyphosat-resistente EPSP-Synthase exprimierte. Sequenzierung der *aroA*-Gene aus Mutante und Wildtyp und der Vergleich der abgeleiteten Aminosäuresequenzen zeigten, daß ein einziger Aminosäureaustausch zur Resistenz geführt hatte (STALKER et al., 1985). Für das mutierte Enzym wurde ein 9-fach höherer I_{50} -Wert gegenüber Glyphosat gemessen.

1984 wurde im Rahmen einer Diplomarbeit am Lehrstuhl für Pflanzenphysiologie der Ruhr-Universität Bochum (SOST, 1984) eine Glyphosat-resistente Mutante von *Klebsiella pneumoniae* (= *Aerobacter aerogenes*) isoliert, die eine Glyphosat-insensitive EPSP-Synthase besaß (SCHULZ et al., 1984). Eine Charakterisierung dieses Enzyms ergab signifikante Unterschiede zum Enzym des Wildtyps (SOST et al., 1984). So besitzt das Mutantenenzym einen niedrigeren Isoelektrischen Punkt (bei pH 4,1 gegenüber pH 4,6) und eine niedrigere Affinität zu den Substraten S3P (4,3-fach) und PEP (16-fach). Da dieses Enzym die bisher größte, bekannte Toleranz gegenüber Glyphosat aufweist (der I_{50} -Wert liegt bei 55 mM gegenüber 15 μ M für den Wildtyp; SCHULZ et al., 1985), erschien es sinnvoll, das *aroA*-Gen dieser Mutante zu klonieren und zu sequenzieren und die daraus abgeleitete Aminosäuresequenz mit der Sequenz des Wildtypenzyms zu vergleichen.

Der Hauptteil der vorliegenden Arbeit befaßt sich aus diesem Grund mit der Klonierung und Sequenzierung der *aroA*-Gene aus *Klebsiella pneumoniae* Wildtyp und der Glyphosat-resistenten Mutante K1 und dem Vergleich der abgeleiteten Aminosäuresequenzen. Darüber hinaus wird die Frage diskutiert, inwieweit die gewonnenen Ergebnisse auf andere Organismen, speziell auf Pflanzen, übertragbar sind. Diese Frage ist über die Grundlagenforschung hinaus natürlich auch von ökonomischem Interesse, wenn man bedenkt, daß



Glyphosat zu den umsatzstärksten Herbiziden zählt, obwohl es bisher nicht selektiv eingesetzt werden kann.

Ein zweiter Teil der Arbeit befaßt sich mit Versuchen zur Erzeugung von Glyphosatresistenz in Pflanzen. Wie bereits erwähnt, sind in Pflanzen bisher keine Glyphosat-resistenten EPSP-Synthasen bekannt. Eine Toleranz gegenüber Glyphosat, die bei vielen pflanzlichen Zellkulturen durch Adaptation auf immer höhere Konzentrationen des Herbizids im Kulturmedium erreicht werden konnte, beruhte in allen Fällen auf einer Überproduktion des sensitiven Enzyms (Literaturzusammenstellung bei AMRHEIN, 1986). Ursachen für die Überproduktion sind auf der einen Seite Amplifikation des *aroA*-Gens, wie zum Beispiel bei *Petunia hybrida* (SHAH et al., 1986), aber auch verstärkte Transkription und langsamerer Abbau des gebildeten Enzyms, wie bei *Corydalis sempervirens* (HOLLÄNDER-CZYTKO et al., 1988).

Glyphosat-tolerante Zellkulturen zu regenerieren bereitet Schwierigkeiten. Der erste Bericht über die erfolgreiche Regeneration einer Glyphosat-toleranten *Nicotiana tabacum* Zellkultur wurde erst während der Fertigstellung der vorliegenden Arbeit veröffentlicht (DYER et al., 1988). So erscheint es einfacher, Glyphosat-tolerante Pflanzen durch gentechnologische Methoden zu erzeugen. Das *aroA*-Gen aus Petunien wurde unter der Kontrolle eines starken Promotors wieder in Petunien eingebracht. Die transgenen Pflanzen zeigten aufgrund einer erhöhten EPSP-Synthase Aktivität eine signifikante Toleranz gegenüber Glyphosat (SHAH et al., 1986). Auch der Versuch, das *aroA*-Gen aus dem Glyphosat-toleranten *Salmonella* Stamm in Tabak und Tomate zu exprimieren, führte in den transformierten Pflanzen zu einer Glyphosattoleranz (COMAI et al., 1985; FILLATTI et al., 1987).

Im Anhang der vorliegenden Arbeit wird der Versuch beschrieben, Glyphosat-resistente Pflanzen durch direkte Anzucht auf Glyphosat-haltigem Medium zu selektieren. Um eine mögliche gegenseitige Beeinflussung von zwei Allelen, die in diploiden Zellen für die EPSP-Synthase codieren, auszuschließen, wurden die Experimente mit haploiden Pflanzen, die durch Antherenkultur gewonnen wurden, durchgeführt.

II. Material und Methoden

1. Bakterienstämme, Phagen, Plasmide

1.1. Bakterien

Klebsiella pneumoniae

1009/III (Wildtyp); aus der Stammsammlung des Lehrstuhls für Pflanzenphysiologie, Ruhr-Universität Bochum.

K1, Glyphosat-resistente Mutante von 1009/III (SCHULZ et al., 1984).

Escherichia coli

K803 (*hsdS*⁻, *gal*⁻, *met*⁻, *supE*), Wirtstamm für Lambda-Klonierung (WOOD, 1966).

JM103 (Δ (*lac pro*), *thi*⁻, *strA*, *supE*, *endA*, *sbcB*, *hsdR*⁻, *F' traD36*, *proAB*, *lacIq*, *ZΔM15*), Wirtstamm für M13-Klonierung (MESSING et al., 1981).

AB2829 (*aroA*⁻, F⁻), EPSP-Synthase defizienter Stamm (PITTARD & WALLACE, 1966).

LCK8 (*lac-3* oder *lacY1*, *galK2*, *galT22*, *metB1*, *hsdR2*, *zjj-202 ::Tn10*, Lambda⁻, *supE44*), Donorstamm zur Konstruktion von *hsdR*⁻-Mutanten; von B.Bachmann, *E.coli* Genetic Stock Center, Yale University, New Haven, USA, zur Verfügung gestellt.

DSK8 (*aroA*⁻, F⁻, *hsdR*⁻, *zjj-202 ::Tn10*), Rezipientenstamm zur Komplementation der *aroA*⁻-Mutation; Konstrukt aus AB2829 und LCK8 (siehe II.3.2.).

1.2. Phagen

Lambda EMBL4, Substitutionsvektor zum Anlegen von Genbanken (FRISCHAUF et al., 1983); von Prof. U. Kück, Lehrstuhl für Allgemeine Botanik, Ruhr-Universität Bochum, zur Verfügung gestellt.

Lambda DS21, EMBL4-Derivat, enthält das *aroA*-Gen aus *Klebsiella pneumoniae* K1; wurde aus der angelegten Genbank (siehe II.3.10.) isoliert.

Lambda DS31, EMBL4-Derivat, enthält das *aroA*-Gen aus *Klebsiella pneumoniae* 1009/III; wurde aus der angelegten Genbank (siehe II.3.10.) isoliert.

P1vir, Phage zur Transduktion von *E.coli*-Genen; von Prof. U. Winkler, Lehrstuhl für Biologie der Mikroorganismen, Ruhr-Universität Bochum, zur Verfügung gestellt.

1.3. Plasmide

pBR322, Klonierungsvektor (BOLIVAR et al., 1977).

pMON6001, pBR327-Derivat, enthält auf einem 2 kbp *Bam* HI/*Hind* III Fragment das *aroA*-Gen aus *E.coli*; von Dr. S. G. Rogers, Monsanto Co., St.Louis, USA, zur Verfügung gestellt.

pDS21, pBR322-Derivat, enthält ein 9 kbp *Eco* RI Fragment aus Lambda DS21 (siehe II.3.11.).

pDS22, pBR322-Derivat, enthält ein 4,2 kbp *Hind* III Fragment aus Lambda DS21 (siehe II.3.11.).

pDS31, pBR322-Derivat, enthält ein 9 kbp *Eco* RI Fragment aus Lambda DS31 (siehe II.3.11.).

pDS32, pBR322-Derivat, enthält ein 4,2 kbp *Hind* III Fragment aus Lambda DS31 (siehe II.3.11.).

M13mp18/19, M13-Sequenzierungsvektoren (NORRANDER et al., 1983).

2. Chemikalien

2.1. Radiochemikalien

Amersham-Buchler, Braunschweig: α -³²P-dATP (15TBq/mmol).

2.2. Fein- und Biochemikalien

Boehringer Mannheim: 5-Bromo-4-Chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranosid (x-gal), Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid (IPTG), Lysozym.

BRL, Eggenstein: Restriktionsendonukleasen *Acc* I, *Bam* HI, *Bgl* II, *Cla* I, *Eco* RI, *Hind* III, *Pst* I, *Sau* 3AI, *Sma* I, *Taq* I; DNaseI; Agarose (Electrophoresis Grade); Lambda DNA/*Hind* III-Fragmente.

Difco, Stuttgart: Tryptone, Yeast Extract.

Genofit, Heidelberg: Lambda In Vitro Packaging Kit "Gigapack Plus".

Monsanto Co., St.Louis: Glyphosat (Analytical Grade).

Pharmacia, Freiburg: T4 DNA-Ligase, ³²P Sequencing Kit, Deaza ³²P Sequencing Mixes, T7 Sequencing Kit.

Sigma, München: Ampicillin, Tetracycline, Heringsperma-DNA.

Schleicher & Schuell, Dassel: Nitrozellulosefilter.

Alle nicht gesondert aufgeführten Chemikalien wurden von verschiedenen Firmen in größtmöglicher Reinheit bezogen.

3. Methoden

3.1. Bakterien- und Phagenanzucht

Die Bakterienanzucht erfolgte entweder in LB-Vollmedium oder M9-Minimalmedium nach MANIATIS et al. (1982). Selektionsmedien enthielten 100µg/ml Ampicillin (LB), 8µg/ml Tetracyclin (LB) oder 10mM Glyphosat (M9), Festmedien 1,5% Agar.

Lambdaphagen wurden als Flüssigkultur oder als Plattenlysate (in 0,7% Weichagar) nach MANIATIS et al. (1982) auf *E.coli* K803 in LB-Medium gezogen. M13-Phagen wurden als Flüssigkultur oder als Plattenlysate auf *E.coli* JM103 in LB-Medium gezogen. Der Weichagar enthielt zur Selektion rekombinanter M13-Phagen 0,02% x-gal und IPTG.

3.2. P1 Transduktion

Mit Hilfe der P1 Transduktion wurde *E.coli* DSK8 (*aroA*⁻, *hsdR*⁻) aus AB2829 und LCK8 konstruiert. Die Herstellung eines P1vir Lysats des *hsdR*⁻-Donorstamms LCK8 erfolgte wie in Procedure 10 (SILHAVY et al., 1984) beschrieben. Die Transduktion des Rezipientenstamms AB2829 wurde nach Procedure 12 (SILHAVY et al., 1984) durchgeführt. 1µl des Transduktionsansatzes wurde auf Tetracyclin-Platten ausgestrichen. Es resultierten ca. 1000 Klone, die durch Transduktion des Transposons Tn10 auf Tetracyclin wachsen konnten. Ein Teil dieser Klone wurden auf Cotransduktion des *hsdR*⁻-Gens überprüft. Hierzu wurden die Klone mit nicht-methyliertem Plasmid pBR322 transformiert (siehe II.3.5.) und die Transformationsrate im Vergleich zu AB2829 bestimmt. Die Cotransduktion des *hsdR*⁻-Gens zeigte sich in einer 10³ bis 10⁴-fachen Transformationsrate gegenüber AB2829. Ein Klon mit entsprechend erhöhter Transformationsrate, der die Bezeichnung DSK8 erhielt, wurde willkürlich für weitere Transformationsexperimente ausgewählt.

3.3. DNA-Isolierung

Hochmolekulare DNA aus *Klebsiella pneumoniae* wurde nach THOMAS et al. (1966) isoliert. Die Isolierung von Plasmid- und Lambda-DNA erfolgte nach MANIATIS et al. (1982). M13-Doppelstrang DNA wurde wie Plasmid-DNA, M13-Einzelstrang DNA zur Sequenzierung nach MESSING (1983) isoliert.

3.4. DNA-Restriktion

Die DNA-Restriktion erfolgte nach Vorschrift und in Puffern der Firma BRL. Es wurde je 1µg DNA in einem Gesamtansatz von 10µl mit 5 Einheiten Restriktionsenzym geschnitten.

3.5. Transformation

Die Transformation von *E.coli* mit Plasmid-DNA wurde nach Protokoll 3 (HANAHAN, 1985) durchgeführt.

3.6. Agarosegelelektrophorese

Die Auftrennung von DNA-Restriktionsfragmenten durch Agarosegelelektrophorese erfolgte in 10x12cm bzw. 20x20cm Flachbettelektrophoresekammern nach MANIATIS et al. (1982).

3.7. Elution von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Die DNA-Fragmente wurden aus den Agarosegelen mit Hilfe des BIOTRAP-Geräts (Schleicher & Schuell) eluiert. Die DNA wurde Phenol-extrahiert und Ethanol-gefällt (MANIATIS et al., 1982) und zur radioaktiven Markierung (siehe II.3.8.) eingesetzt.

3.8. Radioaktive Markierung von DNA

DNA wurde durch Nicktranslation (MANIATIS et al., 1982) radioaktiv markiert. Freie radioaktive Nukleotide wurden durch Ethanol-fällung abgetrennt. Die spezifische Aktivität der markierten DNA betrug durchschnittlich 0,3 MBq/µg.

3.9. DNA-Transfer auf Nitrozellulose und Hybridisierung

DNA aus Agarosegelen wurde durch Southerntransfer (SOUTHERN, 1975) auf Nitrozellulosepapier übertragen. Die Übertragung von Phagenplaques auf Nitrozellulosefilter erfolgte nach MANIATIS et al. (1982). Die Nitrozellulosefilter wurden mit radioaktiv markiertem *aroA*-Fragment aus pMON6001 hybridisiert. Die Hybridisierung erfolgte bei 65°C nach MANIATIS et al. (1982). Nach Waschen und Trocknen wurden die Filter 24h bei -80°C einem Röntgenfilm (Kodak X-Omat AR) exponiert.

3.10. Anlegen einer Genbank und Isolierung *aroA*-positiver Klone

Zur Isolierung des *aroA*-Gens aus *Klebsiella pneumoniae* wt und K1 wurden Genbanken in Lambda EMBL4 angelegt. Lambda-DNA und *K.pneumoniae*-DNA wurden mit *Eco* RI geschnitten. Je 1,6µg Lambda-DNA und 0,8µg *K.pneumoniae*-DNA wurden in einem Gesamtansatz von 10µl mit einer Einheit T4 DNA-Ligase nach Vorschrift inkubiert. Je 4,2µl des Ligationsansatzes wurden mit dem Lambda Verpackungssystem "Gigapack Plus" nach Herstellerangaben *in vitro* verpackt. Die *aroA*-positiven Klone Lambda DS21 und DS31 wurden über Plaquefilterhybridisierung isoliert.

3.11. Subklonierung und Expression der *aroA*-Gene

Zur Subklonierung der *aroA*-Gene wurde Lambda DS31- bzw. DS21-DNA mit *Eco* RI oder *Hind* III geschnitten und in entsprechend geschnittenen Vektor pBR322 ligiert. Der Ligationsansatz enthielt in einem Gesamtvolumen von 40µl 1µg Plasmid-DNA, 3µg Lambda-DNA und eine Einheit T4 DNA-Ligase in Ligationspuffer (MANIATIS et al., 1982). *E.coli* DSK8 wurde mit den Ligationsansätzen transformiert (siehe II.3.5.), der Transformationsansatz auf Ampicillinplatten ausgestrichen. Zur Komplementation der *aroA*-Mutation wurden die Transformanten auf M9-Platten bzw. M9-Platten mit Glyphosat übertragen. Klone, die auf Minimalmedium gewachsen waren, wurden auf EPSP-Synthase Aktivität untersucht.

3.12. Bestimmung der EPSP-Synthase Aktivität

40ml Bakterienkulturen wurden abzentrifugiert, das Bakteriensediment in 200mM Tris/HCl pH7,8; 5mM 2-Mercaptoethanol und 1mM Phenylmethylsulfonylchlorid suspendiert und im Eisbad durch Ultraschallbehandlung aufgebrochen. Nach Zentrifugation wurde der Überstand gegen Aufschlußpuffer dialysiert und der so gewonnene Rohextrakt für die Enzymmessung eingesetzt.

Die Bestimmung der EPSP-Synthase Aktivität erfolgte nach STEINRÜCKEN & AMRHEIN (1984a) über die Bestimmung des freigesetzten Orthophosphats nach LANZETTA et al. (1979). Zur Inhibierung von Phosphatasen enthielt der Reaktionsansatz 0,1mM Natriummolybdat.

Die Proteinbestimmung erfolgte nach der Methode von BRADFORD (1976) mit Rinderserumalbumin als Standard.

3.13. DNA-Sequenzierung

Einzelstrang-DNA wurde nach der Dideoxy-Kettenabbruch-Methode nach SANGER et al. (1977), verändert nach MESSING (1983) sequenziert. Es wurden das "³²P Sequencing Kit" in Verbindung mit den "Deaza ³²P Sequencing Mixes" und das "T7 Sequencing Kit" verwendet. Die Durchführung erfolgte nach den mitgelieferten Protokollen. 2µl Aliquots der Sequenzierungsreaktionen wurden auf 0,4mm dicke 6% Polyacrylamid/Harnstoffgele (40x20cm) aufgetragen und bei 38W, konstantem Strom, über 1,5h elektrophoretisch aufgetrennt (MESSING, 1983). Das feuchte Gel wurde anschließend in Klarsichtfolie eingewickelt und bei -80°C einem Röntgenfilm exponiert.

Die Sequenzanalysen wurden mit den Computerprogrammen von LIPMAN & PEARSON (1985) bzw. MOUNT & CONRAD (1986) durchgeführt.

Alle hier nicht näher beschriebenen Methoden sind entsprechend den Anleitungen bei MANIATIS et al. (1982) durchgeführt worden.

3.14. Sicherheitsmaßnahmen

Alle Transformationsexperimente erfolgten unter L2/B1 Bedingungen gemäß den "Richtlinien zum Schutz vor Gefahren durch *in vitro* rekombinierte Nukleinsäuren" des Bundesministers für Forschung und Technologie (Bonn) vom 28.5.1986.

III. Ergebnisse

1. Identifizierung des *aroA*-Gens in *Klebsiella pneumoniae* DNA

Zur erfolgreichen Klonierung und Sequenzierung des *aroA*-Gens aus *K.pneumoniae* mußte zunächst eine Methode zur Identifizierung des Gens etabliert werden. Da *K.pneumoniae* wie *E.coli* systematisch zu den *Enterobacteriaceae* gehört, bot sich die DNA-DNA-Hybridisierung mit dem *aroA*-Gen aus *E.coli* an. Diese Methode erschien erfolgversprechend, da die Sequenzen der *aroA*-Gene aus *E.coli* und *Salmonella typhimurium*, einer weiteren *Enterobacteriaceae* zu 79,1% übereinstimmen (DUNCAN et al., 1984; STALKER et al., 1985). Das Gen aus *E.coli*, das kloniert auf einem 2 kbp *Bam* HI/*Hind* III Fragment des Plasmids pMON6001 vorliegt, wurde freundlicherweise von Dr. S. G. Rogers, Monsanto Co., zur Verfügung gestellt.

Es wurde hochmolekulare DNA (Länge ca. 150 kbp) aus den *K.pneumoniae* Stämmen isoliert, mit verschiedenen Restriktionsenzymen geschnitten und je 1µg auf 0,7% Agarosegelen aufgetrennt. Die DNA wurde durch Southerntransfer auf Nitrozellulose übertragen und mit dem radioaktiv markierten *aroA*-Fragment bei 65°C hybridisiert. Aufgrund der hohen Temperatur wurde eine spezifische Hybridisierung erwartet.

Das Autoradiogramm eines typischen Hybridisierungsexperiments ist in Abb.2 dargestellt. Durch Vergleich der R_f -Werte mit Markerfragmenten (*Lambda/Hind* III) wurde die Größe der hybridisierenden Banden bestimmt. Einen Überblick über die verwendeten Restriktionsenzyme und die Größe der hybridisierenden Banden gibt Tab.1. Nach Restriktion der DNA mit *Cla* I, *Sma* I und *Pst* I hybridisierten mehr als eine Bande. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, daß im *aroA*-Gen Schnittstellen für diese Enzyme vorhanden sind.

Bei allen Experimenten unterschied sich die DNA aus wt und K1 weder in der Größe noch in der Intensität ihrer Hybridisierungssignale.

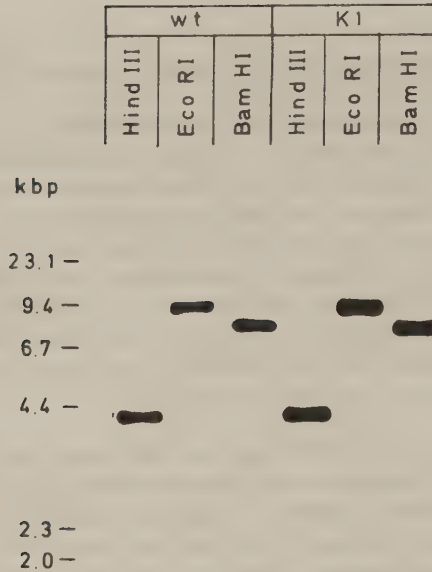


Abb.2: Southerntransfer und Hybridisierung von *K.pneumoniae*-DNA.

DNA aus wt und K1 wurde mit verschiedenen Restriktionsenzymen geschnitten, auf Nitrozellulose übertragen und mit ^{32}P -markiertem *aroA*-Fragment aus *E.coli* hybridisiert.

Enzym	Erkennungssequenz	Größe (in kbp)
<i>Bam</i> HI	GGATCC	8,5
<i>Bgl</i> II	AGATCT	8,3
<i>Cla</i> I	ATCGAT	6,9
		5,6
<i>Eco</i> RI	GAATTC	9,0
<i>Hind</i> III	AAGCTT	4,2
<i>Pst</i> I	CTGCAG	5,1
		2,9
		0,8
<i>Sma</i> I	CCCGGG	15
		10

Tab.1: Größe der hybridisierenden *K.pneumoniae* DNA-Fragmente bei Verwendung verschiedener Restriktionsenzyme. Die Hybridisierung erfolgte mit dem *aroA*-Gen aus *E.coli*.

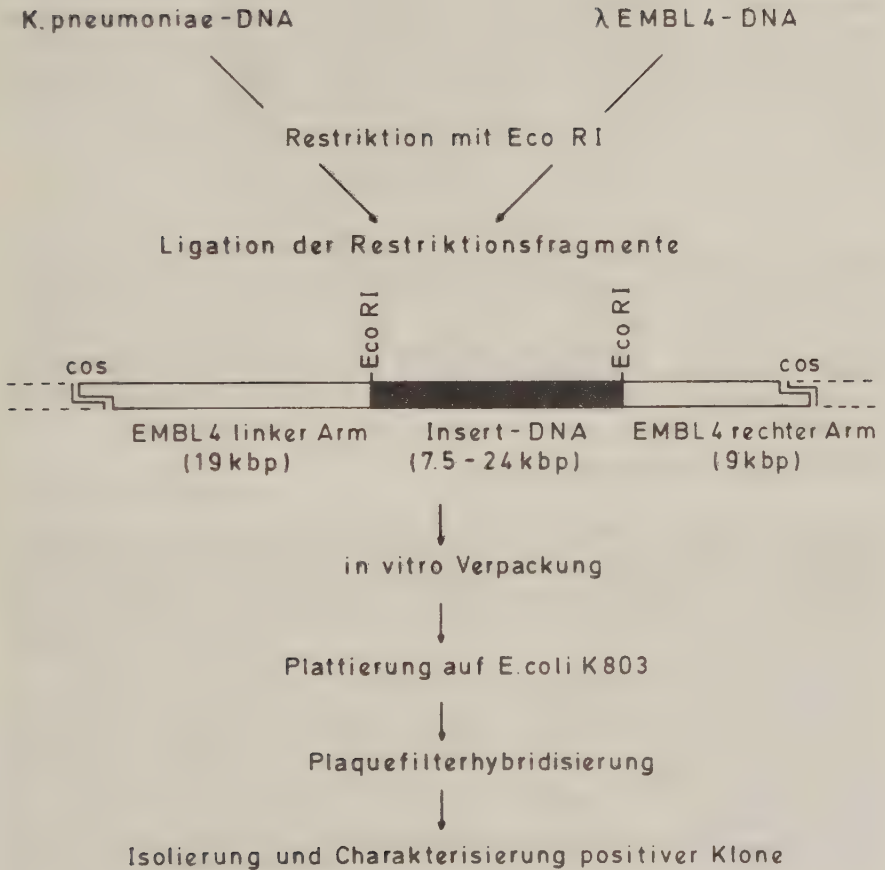


Abb.3: Schema der Versuchstrategie zur Konstruktion einer Genbank in Lambda EMBL4.

2. Anlegen von *K.pneumoniae* Genbanken in EMBL4

Da durch die Hybridisierungsexperimente sicher gestellt war, daß durch Restriktion mit *Eco* RI das *aroA*-Gen nicht zerschnitten wird, wurden die Genbanken mit Hilfe dieses Enzyms angelegt. Einen Überblick über die Versuchstrategie gibt Abb.3. Nach Restriktion, Ligation und *in vitro* Verpackung von 1 µg ligierter DNA enthielten die Genbanken je 10⁵ voneinander unabhängige Klone. Da nur DNA *in vitro* verpackt wird, die im Abstand von 35,5 bis 52 kbp zwei cos-Stellen besitzt (HOHN, 1979), betrug die Länge der *K.pneumoniae* Insert-DNA zwischen 7,5 und 24 kbp. Die Vollständigkeit einer Genbank kann mit der Formel:

$$N = \frac{\ln(1-P)}{\ln(1-f)}$$

abgeschätzt werden (CLARKE & CARBON, 1976), wobei N die Anzahl der Klone, P die gewünschte Wahrscheinlichkeit und f das Größenverhältnis der Insertion zur Gesamt-DNA ist. Bei einer Durchschnittsgröße der Insert-DNA von 16 kbp ist eine beliebige DNA-Sequenz mit 99% Wahrscheinlichkeit in 1000 Klonen enthalten. Die angelegten Genbanken sind daher repräsentativ und mußten das *aroA*-Gen enthalten.

3. Identifizierung *aroA*-positiver Klone

Ein Teil der Genbanken wurde auf *E.coli* K803 plattiert (ca. 2000 Klone/ Agarplatte), die Phagenplaques auf Nitrozellulose übertragen und mit ³²P-markiertem *aroA*-Fragment aus pMON6001 hybridisiert. Das Ergebnis der Hybridisierung von Plaques der K1-Genbank ist in Abb.4 dargestellt. Mögliche positive Klone (Pfeile) wurden aus dem Agar ausgestochen und erneut auf K803 plattiert (ca. 200 Klone/Platte). Nach erneuter Hybridisierung zeigte nur noch einer von fünf Plaquefiltern positive Signale. Um endgültige Sicherheit zu erhalten, wurden von den entsprechenden Agarplatten jeweils drei einzelne Plaques ausgestochen und auf K803 durch Flüssigkultur vermehrt. Nach Extraktion der DNA wurden die Inserts mit *Eco* RI ausgeschnitten. Die Restriktionsfragmente wurden auf einem Agarosegel aufgetrennt, auf Nitrozellulose übertragen und hybridisiert. Da nur die ausgeschnittenen Insert-Fragmente hybridisierten, konnte davon ausgegangen werden, daß die isolierten Klone tatsächlich das *aroA*-Gen enthielten. Auf diese Art konnte aus 2000 ursprünglich plattierten Klonen jeweils ein positiver Klon isoliert werden. Die Klone wurden mit Lambda DS21 (für K1) und Lambda DS31 (für wt) bezeichnet.

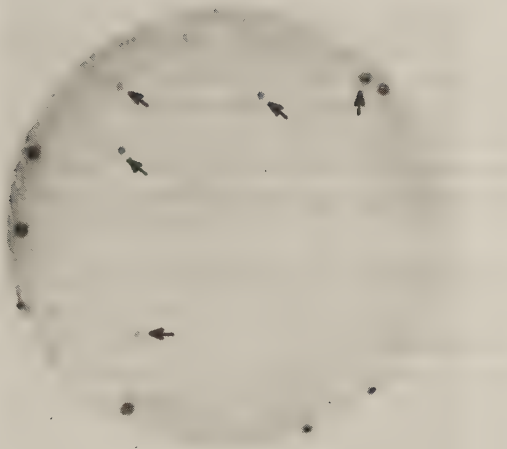


Abb.4: Plauefilterhybridisierung von 2000 Klonen der K1-Genbank. Positive Hybridisierungssignale sind durch Pfeile gekennzeichnet.

4. Restriktionsanalyse

Zur Bestimmung der Insert-Größe von Lambda DS31/21 und der Lokalisierung des *aroA*-Gens wurde eine Restriktionskarte erstellt (Abb.5). Der Übersichtlichkeit halber sind nur die wichtigsten Schnittstellen auf dem Insert eingezeichnet.

Die Ergebnisse bestätigen die Resultate, die aus den Hybridisierungsexperimenten mit Gesamt-DNA gewonnen wurden. Das *aroA*-Gen befindet sich auf einem 9,0 kbp großen *Eco* RI Fragment und kann mit *Hind* III auf einem 4,2 kbp großen Fragment ausgeschnitten werden. Für die Restriktionsenzyme *Sma* I und *Cla* I existieren jeweils eine, für *Pst* I zwei Schnittstellen im *aroA*-Gen. Die Restriktionskarten von Lambda DS31 und DS21 unterscheiden sich nicht.

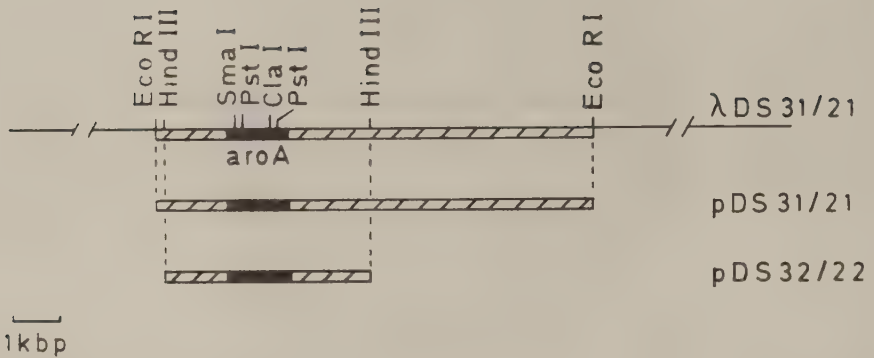


Abb.5: Restriktionskarten von Lambda DS31/21 und Subklonierungsstrategie der *aroA*-Gene. pDS21/22 wurden durch Insertion von Fragmenten aus Lambda DS21 in pBR322 erhalten, pDS31/32 entsprechend aus Lambda DS31.

Extrakt	EPSP-Synthase Aktivität	
	spez.Akt. (nkat/mg Protein)	Akt. bei 5mM Glyphosat (% der spez.Akt.)
<i>K.pneumoniae</i> wt	0,49	0
<i>K.pneumoniae</i> K1	0,48	101
<i>E.coli</i> DSK8	0	-
<i>E.coli</i> DSK8/pBR322	0	-
<i>E.coli</i> DSK8/pDS31	18,2	0
<i>E.coli</i> DSK8/pDS32	15,6	0
<i>E.coli</i> DSK8/pDS21	7,13	96
<i>E.coli</i> DSK8/pDS22	8,62	99

Tab.2: spezifische Aktivität der EPSP-Synthase in Rohextrakten verschiedener Bakterienstämme und Einfluß von Glyphosat auf die Aktivität.

5. Subklonierung und Expression der *aroA*-Gene

Um Klonierungsartefakte, die durch Hybridisierung nicht erfaßt werden können, auszuschließen, wurde der Versuch unternommen, die klonierten *aroA*-Gene zu exprimieren. Die Expression einer enzymatisch aktiven EPSP-Synthase liefert den Beweis, daß tatsächlich das komplette *aroA*-Gen kloniert wurde. Weiterhin läßt sich durch Hemmversuche der enzymatischen Aktivität mit Glyphosat überprüfen, ob nach der Klonierung des Gens aus der Mutante K1 die Resistenz erhalten geblieben war.

Zur Expression der *aroA*-Gene wurden die *Eco* RI und *Hind* III-Fragmente aus Lambda DS31 bzw. DS21 in pBR322 subkloniert und so die Plasmide pDS21/31 bzw. pDS22/32 konstruiert (Abb.5).

Mit der Ausnahme der *nif*-Gene in *Klebsiella* (BEYNON et al., 1983) wurde bisher bei allen untersuchten *Enterobacteriaceae* eine Übereinstimmung in den Promotorsequenzen unterschiedlicher Gene festgestellt (ROSENBERG & COURT, 1979; HAWLEY & McCLURE, 1983). Es wurde daher kein spezieller Expressionsvektor zur Subklonierung verwendet, da davon ausgegangen wurde, daß das *aroA*-Gen über den eigenen Promotor exprimiert wird.

Um eine Beeinflussung der Ergebnisse durch eine endogene Enzymaktivität auszuschließen, mußte ein Rezipientenstamm für die Transformation gewählt werden, der keine eigene EPSP-Synthase Aktivität besitzt. Die von WOOD (1966) isolierte *E.coli* K12 Mutante AB2829 erfüllte diese Voraussetzung. Dieser Stamm läßt sich allerdings nicht ohne weiteres mit Fremd-DNA transformieren, da er ein intaktes Restriktionssystem besitzt (Genotyp: *hsdR*⁺). Dieses physiologisch wichtige System, das *E.coli* K12 z.B. vor Infektion mit Bakteriophagen schützt, erkennt spezifische Methylierungsmuster auf der DNA (ARBER & LINN, 1969; MESELSON & YUAN, 1968). Besitzt die DNA diese Methylierungen nicht, wird sie von einer Endonuklease gespalten und anschließend von Exonukleasen vollständig abgebaut. Eigene DNA wird vor der Restriktion durch eine Methylase geschützt (Genotyp: *hsdM*⁺).

Für eine erfolgreiche Transformation mußten daher entweder die Plasmide entsprechend methyliert werden oder das Restriktionsenzym ausgeschaltet werden. Eine Methylierung kann durch Transformation eines *E.coli* K12 Stamms erreicht werden, der den Genotyp *hsdR*⁻, *hsdM*⁺ besitzt (z.B. DH1; MESELSON & YUAN, 1968). Die methylierten Plasmide müssen anschließend wieder aus den Transformanden isoliert werden, um damit AB2829 zu transformieren. Diese Methode ist zeitaufwendig, außerdem können bestimmte Plasmidspezies dabei verloren gehen.

Deshalb erschien es sinnvoll, über P1-Transduktion einen *hsdR*⁻-Stamm aus AB2829 zu konstruieren. Es wurde ein P1vir Lysat von *E.coli* LCK8 hergestellt. LCK8 bot sich als Donorstamm an, da er neben dem *hsdR*⁻-Gen bei 99 Minuten auf dem *E.coli* Chromosom das Transposon Tn10 trägt (BACHMANN, pers. Mitteilung), das für Tetracyclinresistenz codiert (CALOS & MILLER, 1980). Nach Infektion von AB2829 konnten transduzierte Zellen durch Plattierung auf Tetracyclin-haltigen Platten isoliert werden. Von den resultierenden Klonen wurden 20 auf Cotransduktion des *hsdR*⁻-Gens überprüft. Dazu wurden die Klone mit nicht methyliertem Plasmid pBR322 transformiert. 7 Stämme, das entspricht einer Cotransduktionsrate von 35%, zeigten eine 10³- bis 10⁴-fache Transformationsrate gegenüber AB2829. Einer dieser Klone, DSK8, wurde für die Expressionsexperimente willkürlich ausgewählt.

E.coli DSK8 wurde mit den Plasmidkonstrukten pDS21/31 bzw. pDS22/32 transformiert. Die Transformanden konnten im Gegensatz zu DSK8 auf Minimalmedium wachsen und zeigten Toleranz gegenüber 10mM Glyphosat im Medium. Es wurden Bakterienrohextrakte hergestellt, in denen die EPSP-Synthase Aktivität in An- und Abwesenheit von Glyphosat bestimmt wurde (Tab.2). Alle mit pDS-Plasmiden transformierten DSK8-Klone zeigten eine deutlich gesteigerte Enzymaktivität (15 bis 35fach) gegenüber *Klebsiella*. Die Orientierung der Inserts im Plasmid hatte keinen Einfluß auf die Enzymaktivität. Die Aktivität der klonierten EPSP-Synthase aus K1 konnte durch Glyphosat nicht, die Aktivität des Enzyms aus dem Wildtyp dagegen vollständig, inhibiert werden.

6. Sequenzierung des *aroA*-Gens aus *K.pneumoniae* wt

Die Nukleotidsequenz eines 1565 bp großen DNA-Fragments wurde mit Hilfe der Dideoxy-Kettenabbruch-Methode unter Verwendung der Vektoren M13mp18/19 ermittelt (MESSING, 1983).

Aufgrund intramolekularer Sekundärstrukturbildung, sogenannten Hoogsteen Basenpaarungen (MIZUSAWA et al., 1986), die vorwiegend in GC-reichen Regionen auftraten, kam es allerdings teilweise zu "Bandenkompressionen" auf den Sequenzierungsgelen, die eine Interpretation der DNA-Sequenz erschwerten. Dieses Problem konnte durch die Verwendung der "Deaza ³²P Sequencing Mixes" (Pharmacia) umgangen werden. In diesen Reaktionsansätzen ist dGTP durch 7-deaza-dGTP ersetzt, wodurch benachbarte Guaninreste keine Wasserstoffbrücken mehr ausbilden können.

Ein Teil der Sequenz wurde mit dem neu eingeführten "T7 Sequencing Kit" (Pharmacia) ermittelt. Die T7-Polymerase hat gegenüber dem üblich verwendeten Klenow Fragment der *E.coli* DNA-Polymerase I verschiedene Vorteile (TABOR & RICHARDSON, 1987). Wichtigster Punkt ist die Bildung längerer DNA-Fragmente (≥ 1kb) mit einer gleichmäßigeren Verteilung der radioaktiven Markierung. Durch Verwendung des "T7 Sequencing Kit" war es daher möglich, in einzelnen M13-Klonen die Sequenz von bis zu 450 Basen zu bestimmen.

Einen Überblick über die Sequenzierungsstrategie gibt Abb.6. Zur Absicherung der Sequenz wurden weitgehend beide komplementären Stränge sequenziert. Wo dieses nicht möglich war, wurde die Sequenz von mindestens zwei voneinander unabhängigen Klonen bestimmt. Die vollständige Nukleotidsequenz ist in Abb.7 wiedergegeben.

Der sequenzierte Bereich enthält einen offenen Leserahmen von 1284 Nukleotiden, der große Homologien zum *aroA*-Gen aus *E.coli* (78,3%) und aus *S.typhimurium* (77,9%) aufweist. Stromaufwärts des ATG Startcodons konnten keine Promotor-ähnlichen DNA-Sequenzen identifiziert werden. Dafür wurde das Ende eines weiteren offenen Leserahmens identifiziert, der große Homologie zum *serC*-Gen aus *E.coli* aufweist (80,2%). Diese Daten deuten darauf hin, daß sich das *aroA*-Gen von *K.pneumoniae* wie bei *E.coli* (DUNCAN & COGGINS, 1986) und *S.typhimurium* (HOISETH & STOCKER, 1985) auf einem Operon befindet.

Die aus der Nukleotidsequenz abgeleitete Proteinsequenz für die EPSP-Synthase ist ebenfalls in Abb.7 dargestellt. Das *aroA*-Gen codiert für ein 427 Aminosäuren langes Protein mit einem Molekulargewicht von 45976 Dalton. Durch SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese war ein vergleichbares Molekulargewicht von 42500 Dalton bestimmt worden (SOST et al., 1984).

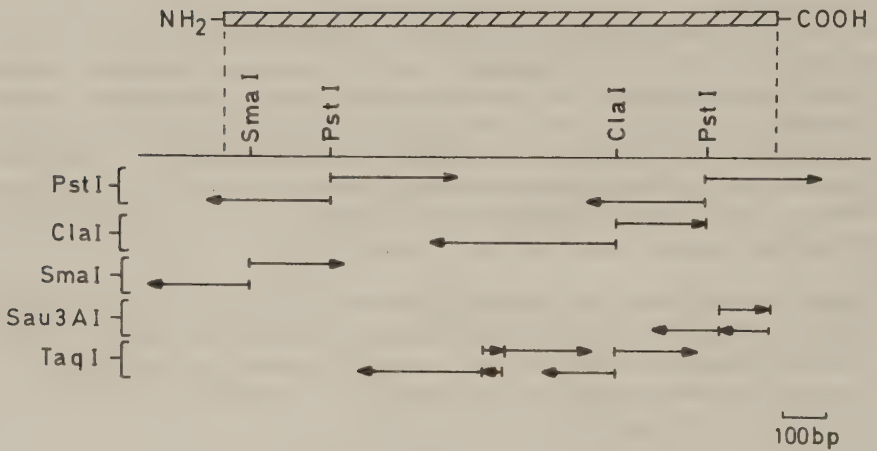


Abb.6: Sequenzierungsstrategie für das *aroA*-Gen aus *Klebsiella pneumoniae*. Der codierende Bereich ist durch einen Balken, die Schnittstellen der verwendeten Restriktionsenzyme sind durch senkrechte Striche dargestellt. Die horizontalen Pfeile repräsentieren Richtung und Länge der ermittelten Sequenz.

															<i>serC</i>																		
															cys	gly	gly	met	arg	ala	ser	ile	tyr										
															TGT	GGC	GGC	ATG	CGT	GCC	TCT	ATC	TAT										
	asn	ala	met	pro	leu	ala	gly	val	lys	ala	leu	thr	asp	phe	met																		
	AAC	GCG	ATG	CCG	CTG	GCG	GGC	GTG	AAG	GCA	CTG	ACC	GAC	TTT	ATG																		
	gln	asp	phe	glu	arg	arg	his	gly	ter																								
	CAG	GAT	TTT	GAA	CGC	CGC	CAC	GGC	TAA	T C	A T	C C	T C	C T	G T																		
	T T	T T	C A	T C	C C	C G	C G	G C	T G	G T	C T	G C	G G	G G	T T																		
	T T	T A	T T	C T	G T	T T	G T	T T	G A	G A	G T	T A	A G	T T	T G																		
																	<i>aroA</i>																
1	met	glu	ser	leu	thr	leu	gln	pro	ile	ala	arg	val	asp	gly	thr																		
	ATG	GAA	TCC	CTG	ACG	TTA	CAA	CCC	ATT	GCG	CGA	GTC	GAT	GGC	ACC																		
46	val	asn	leu	pro	gly	ser	lys	ser	val	ser	asn	arg	ala	leu	leu																		
	GTG	AAC	CTG	CCC	GGG	TCA	AAA	AGT	GTC	TCT	AAC	CGT	GCT	TTG	CTG																		
91	leu	ala	ala	leu	ala	arg	gly	thr	thr	val	leu	thr	asn	leu	leu																		
	CTG	GCG	GCT	TTG	GCC	CGT	GGC	ACC	ACG	GTG	CTG	ACC	AAC	CTG	CTG																		
136	asp	ser	asp	asp	val	arg	his	met	leu	asn	ala	leu	ser	ala	leu																		
	GAC	AGC	GAC	GAT	GTA	CGC	CAT	ATG	CTG	AAT	GCC	CTG	AGC	GCC	CTG																		
181	gly	val	his	tyr	val	leu	ser	ser	asp	arg	thr	arg	cys	glu	val																		
	GGA	GTT	CAT	TAC	GTT	CTG	TCT	TCT	GAC	CGT	ACC	CGC	TGT	GAA	GTG																		
226	thr	gly	thr	gly	gly	pro	leu	gln	ala	gly	ser	ala	leu	glu	leu																		
	ACC	GGC	ACC	GGT	GGG	CCG	CTG	CAG	GCC	GGC	AGT	GCG	CTG	GAG	CTG																		
271	phe	leu	gly	asn	ala	ALA	gly	thr	ala	met	arg	pro	leu	ala	ala	ala																	
	TTC	CTC	GGT	AAC	GCA	GGT	ACC	GCC	ATG	CGT	CCG	CTG	GCC	GCC	GCG																		
						C																											
316	leu	cys	leu	gly	ser	asn	asp	ile	val	leu	thr	gly	glu	pro	arg																		
	CTG	TGT	CTG	GGC	AGC	AAC	GAT	ATC	GTA	TTG	ACC	GGC	GAG	CCG	CGC																		
361	met	lys	glu	arg	pro	ile	gly	his	leu	val	asp	ala	leu	arg	gln																		
	ATG	AAA	GAG	CGC	CCG	ATT	GGC	CAT	CTG	GTT	GAC	GCT	CTG	CGC	CAG																		
406	gly	gly	ala	gln	ile	asp	tyr	leu	glu	gln	glu	asn	tyr	pro	pro																		
	GGC	GGC	GCG	CAG	ATT	GAT	TAT	CTG	GAG	CAG	GAA	AAC	TAT	CCG	CCT																		
451	leu	arg	leu	arg	gly	gly	phe	thr	gly	gly	asp	val	glu	val	asp																		
	CTG	CGC	CTG	CGC	GGC	GGC	TTT	ACC	GGC	GGC	GAC	GTT	GAA	GTT	GAC																		
496	gly	ser	val	ser	ser	gln	phe	leu																									

Abb.7: Nukleotidsequenz (nicht codogener Stang) und abgeleitete Aminosäuresequenz des *aroA*-Gens aus *K.pneumoniae*.

Die Nukleotide sind vom Startcodon des *aroA*-Gens an durchgehend nummeriert. Die Mutation im Gen von *K.pneumoniae* K1, die durch Aminosäureaustausch (Gly-96 → Ala) zur Glyphosatresistenz führt, ist durch einen Kasten dargestellt.

pro leu ala pro gln asp thr val ile ala ile lys gly glu leu
 541 CCA CTG GCG CCG CAG GAT ACC GTC ATC GCG ATT AAA GGC GAG CTG
 val ser arg pro tyr ile asp ile thr leu his leu met lys thr
 586 GTT TCC AGA CCG TAT ATC GAC ATC ACG CTG CAT CTG ATG AAA ACA
 phe gly val glu val glu asn gln ala tyr gln arg phe ile val
 631 TTC GGC GTT GAG GTC GAA AAT CAG GCC TAT CAG CGC TTT ATT GTC
 arg gly asn gln gln tyr gln ser pro gly asp tyr leu val glu
 676 CGC GGC AAT CAG CAG TAC CAG TCG CCG GGT GAT TAC CTG GTG GAA
 gly asp ala ser ser ala ser tyr phe leu ala ala gly ala ile
 721 GGG GAT GCC TCG TCG GCA TCT TAT TTC CTT GCT GCC GGC GCC ATC
 lys gly gly thr val lys val thr gly ile gly arg asn ser val
 766 AAA GGT GGA ACG GTA AAA GTT ACC GGT ATC GGC CGC AAC AGC GTG
 gln gly asp ile arg phe ala asp val leu glu lys met gly ala
 811 CAG GGC GAT ATT CGT TTT GCC GAT GTC CTG GAA AAA ATG GGG GCG
 thr val thr trp gly glu asp tyr ile ala cys thr arg gly glu
 856 ACC GTC ACC TGG GGT GAG GAT TAT ATT GCC TGT ACC CGC GGC GAG
 leu asn ala ile asp met asp met asn his ile pro asp ala ala
 901 CTG AAT GCT ATC GAT ATG GAT ATG AAC CAT ATT CCG GAT GCG GCA
 met thr ile ala thr ala ala leu phe ala arg gly thr thr thr
 946 ATG ACT ATC GCC ACC GCG GCG CTG TTT GCC AGG GGC ACT ACC ACG
 leu arg asn ile tyr asn trp arg val lys glu thr asp arg leu
 991 CTA CGC AAC ATC TAT AAC TGG CGC GTC AAA GAG ACC GAC CGT CTG
 1036 phe ala met ala thr glu leu arg lys val gly ala glu val glu
 TTT GCG ATG GCC ACC GAA CTG CGT AAA GTG GGC GCC GAA GTG GAA
 glu gly glu asp tyr ile arg ile thr pro pro leu thr leu gln
 1081 GAG GGA GAG GAT TAC ATT CGC ATT ACG CCT CCG CTG ACG CTG CAG
 phe ala glu ile gly thr tyr asn asp his arg met ala met cys
 1126 TTT GCC GAG ATT GGC ACC TAT AAC GAT CAC CGT ATG GCA ATG TGT
 phe ser leu val ala leu ser asp thr pro val thr ile leu asp
 1171 TTC TCG CTG GTG GCG TTG TCT GAT ACG CCG GTG ACT ATT CTT GAC
 pro lys cys thr ala lys thr phe pro asp tyr phe gly gln leu
 1216 CCG AAA TGC ACG GCG AAA ACC TTC CCG GAT TAC TTC GGG CAG TTG
 1261 ala arg ile ser thr leu ala ter
 GCG CGG ATC AGC ACG CTG GCG TAA C G T T C G C C T T C G C T
 A A A A G T C A A A A C G A A A A A G T A A A A T A T T G T
 C A T C T T C C G G G C T G G C G C T C C G T C A G G C T A
 T A A T T G C G C C G T A T T C T T C T G C G T T T C A T T
 T C T G G T A

7. Codongebrauch im *aroA*-Gen von *K.pneumoniae*

Der Codongebrauch im *aroA*-Gen aus *K.pneumoniae* ist in Tab.3 dargestellt. Auffällig ist die Bevorzugung von G + C an dritter Position der Codons (speziell bei Leu, Pro, Thr, Ala und Gln), aus der sich ein GC-Gehalt von 57% im *aroA*-Gen ergibt. [GC-Gehalt der Gesamt-DNA: 56-59% (SHAPIRO, 1970)].

Ähnliche Beobachtungen wurden auch bei anderen Genen aus *K.pneumoniae*, z.B. den Genen des *lac*-Operons (BUVINGER & RILEY, 1985), gemacht.

TTT (phe)	6	TCT (ser)	5	TAT (tyr)	8	TGT (cys)	4
TTC (phe)	7	TCC (ser)	3	TAC (tyr)	5	TGC (cys)	1
TTA (leu)	1	TCA (ser)	1	TAA (ter)	1	TGA (ter)	0
TTG (leu)	5	TCG (ser)	5	TAG (ter)	0	TGG (trp)	2
CTT (leu)	2	CCT (pro)	2	CAT (his)	5	CGT (arg)	8
CTC (leu)	1	CCC (pro)	2	CAC (his)	1	CGC (arg)	14
CTA (leu)	1	CCA (pro)	1	CAA (gln)	1	CGA (arg)	1
CTG (leu)	39	CCG (pro)	13	CAG (gln)	14	CGG (arg)	1
ATT (ile)	12	ACT (thr)	3	AAT (asn)	4	AGT (ser)	2
ATC (ile)	10	ACC (thr)	21	AAC (asn)	11	AGC (ser)	7
ATA (ile)	0	ACA (thr)	1	AAA (lys)	11	AGA (arg)	1
ATG (met)	13	ACG (thr)	10	AAG (lys)	0	AGG (arg)	1
GTT (val)	7	GCT (ala)	5	GAT (asp)	17	GGT (gly)	7
GTC (val)	8	GCC (ala)	19	GAC (asp)	9	GGC (gly)	24
GTA (val)	4	GCA (ala)	4	GAA (glu)	10	GGA (gly)	3
GTG (val)	10	GCG (ala)	17	GAG (glu)	12	GGG (gly)	5

Tab.3: Codongebrauch im *aroA*-Gen aus *K.pneumoniae*.

IV. Anhang

Versuche zur Selektion Glyphosat-resistenter, haploider Pflanzen

Glyphosat wurde 1971 von der Monsanto Company unter dem Handelsnamen "ROUNDUP" als Totalherbizid auf den Markt gebracht (BAIRD et al., 1971). Trotz des langjährigen Einsatzes in der Landwirtschaft gibt es bis heute keine Berichte über eine natürlich auftretende Toleranz bei Pflanzen gegenüber Glyphosat. Für andere Herbizide, wie zum Beispiel für den Photosynthese-Hemmstoff Atrazin, wurden nach der kommerziellen Einführung in der Landwirtschaft Resistenzen beobachtet (RYAN, 1970). Der Grund für das fehlende Auftreten von natürlicher Toleranz gegenüber Glyphosat ist sicherlich der rasche Abbau des Herbizids durch Bodenorganismen (RUEPPEL et al., 1977). Durch die kurze Verweildauer im Boden fehlt damit der nötige Selektionsdruck, der zu einer Resistenz führt.

Die biochemische Analyse Hemmstoff-resistenter Organismen ist generell hilfreich für die Aufklärung des Wirkmechanismus der Hemmstoffe. So konnten 1984 CHALEFF & RAY mit Hilfe resistenter Zelllinien den molekularen Wirkmechanismus der Sulfonylharnstoff-Herbizide aufklären. Deshalb erschien es auch für die Grundlagenforschung im Falle des Glyphosats wünschenswert, resistente Pflanzen zu selektieren. Bei vielen pflanzlichen Zellkulturen konnte durch langsame Erhöhung der Glyphosatkonzentration im Kulturmedium eine Toleranz gegenüber Glyphosat erreicht werden (siehe AMRHEIN, 1986). Die Toleranz beruhte in allen untersuchten Fällen auf einer Überproduktion der Glyphosat-sensitiven EPSP-Synthase. Diese Beobachtungen sind Indizien dafür, daß der molekulare Wirkort von Glyphosat nicht nur *in vitro* sondern auch *in vivo* die EPSP-Synthase ist. Aufgrund der Schwierigkeiten, die toleranten Zellkulturen zu regenerieren, um an ganzen Pflanzen den Toleranzmechanismus gegenüber Glyphosat zu überprüfen, wurde der Versuch unternommen, Glyphosat-resistente Pflanzen direkt auf Glyphosat-haltigem Kulturmedium zu selektieren. Dabei sollten Pflanzen isoliert werden, die eine Glyphosat-insensitive EPSP-Synthase besitzen.

1. Regeneration haploider Pflanzen aus Antheren von *Nicotiana* -Arten

Für weitere biochemische Untersuchungen, aber auch für weitere Züchtungsexperimente, erschien es sinnvoll, haploide Pflanzen zu erzeugen. Haploide Pflanzen haben gegenüber diploiden Pflanzen zwei wesentliche Vorteile (MELCHERS & LABIB, 1970): Zum einen ist die Mutationsrate im haploiden Chromosomensatz höher, zum anderen wird beim Auffinden von Mutanten Zeit durch die direkte Segregation homozygoter Pflanzen gespart. Eine Überprüfung der Literatur zeigte, daß die Arten der Familie der *Solanaceae* besonders für die Produktion haploider Pflanzen durch Antherenkultur geeignet sind (Überblick bei VASIL & NITSCH, 1975). Darüber hinaus besteht bei diesen Arten die Möglichkeit, schnell und einfach Zellsuspensions- und Protoplastenkulturen anzulegen und daraus wieder Pflanzen zu regenerieren.

Für die Etablierung der Antherenkultur wurden *Nicotiana tabacum* cv. Xanthi und *N. sylvestris* ausgewählt. Die Pflanzen wurden unter Gewächshausbedingungen angezogen. Da sich nur Mikrosporen zu haploiden Pflanzen regenerieren lassen, die sich im frühen Einkernstadium ihrer Entwicklung befinden, konnten die Blüten nur in einem bestimmten Entwicklungsstadium geerntet werden. Nach NITSCH & NITSCH (1969) wurden für *N. tabacum* Blüten im Stadium 2, für *N. sylvestris* Blüten im Stadium 3 geerntet. Die Blüten wurden nach Vorschrift oberflächensterilisiert und die Antheren steril entnommen. Für eine größtmögliche Ausbeute an haploiden Pflanzen wurden verschiedene Kulturmedien und Kulturbedingungen erprobt. Es wurden jeweils 50 Antheren unter verschiedenen Bedingungen kultiviert und die gebildeten Embryonen nach 3 Wochen gezählt. Die meisten Pflanzen regenerierten auf Nitsch-Medium (NITSCH & NITSCH, 1969) nach der "bilayer"-Methode (JOHANSSON et al., 1982) (Abb.9). Dabei wird das Festmedium, das 1% Aktivkohle enthält, mit flüssigem Medium, in dem sich die Antheren befinden, überschichtet. Die Kulturen wurden bis zur Ausbildung von Embryonen bei 30°C im Dauerdunkel gehalten und anschließend im Wechsellicht weiterkultiviert. Die Photoperiode betrug 16h Licht durch Osram Fluora Lampen (ca. 5000 Lux) bei 28°C und 8h Dunkel bei 20°C. Unter diesen Kulturbedingungen regenerierten für *N. tabacum* 15 Pflanzen/Anthere, für *N. sylvestris* 2 Pflanzen/Anthere.

Die Bestimmung des Ploidiegehaltes der Pflanzen erfolgte über Chromosomenzählungen an Wurzelspitzen (EVANS & REED, 1981). Mehr als 90% der untersuchten Pflanzen besaßen einen haploiden Chromosomensatz.

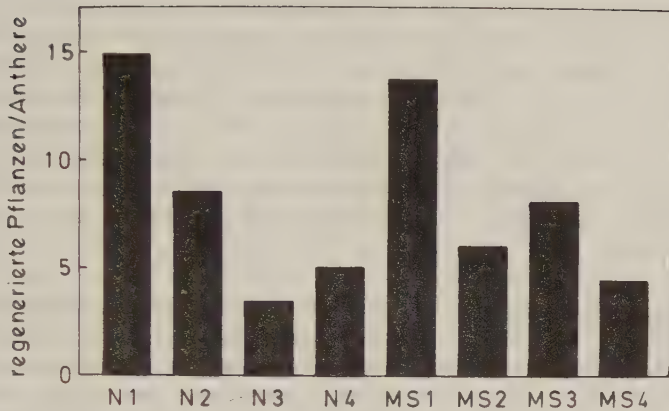


Abb.9: Einfluß verschiedener Kulturbedingungen auf die Bildung haploider Pflanzen aus Mikrosporen von *N.tabacum*.

N1-4: Medium nach NITSCH & NITSCH (1969).

MS1-4: Medium nach MURASHIGE & SKOOG (1962).

N1-2, MS1-2: + 1% Aktivkohle.

N1, N3, MS1, MS3: "bilayer"-Medium (JOHANSSON et al., 1982).

Um den Einfluß von Glyphosat auf die Ausbildung von haploiden Pflanzen zu untersuchen, wurde die Zahl der Embryonen in Abhängigkeit von der Glyphosatkonzentration bestimmt (Abb.10). Für *N.tabacum* wurden für jede Glyphosatkonzentration 100 Antheren, für *N.sylvestris* 500 Antheren ausgelegt. Der Iso-Wert der Bildung von haploiden Pflanzen wurde für Glyphosat mit 36µM bestimmt. Bei Glyphosatkonzentrationen $\geq 0,2$ mM entwickelten sich auch nach zwei Monaten keine Pflänzchen. Bei Glyphosatkonzentrationen zwischen 5 und 100 µM unterschied sich der Habitus der Pflanzen deutlich von dem der Kontrollen. Während es auf Medium ohne Glyphosat zu einer Embryogenese der Haplonten kam, die sich nicht von der Keimung diploider Pflanzen aus Samen unterschied, entwickelten sich die Haplonten auf Medium mit geringen Glyphosatkonzentrationen zu undifferenzierten Teratomen. Erst nach Überführung der Teratome auf Medium ohne Glyphosat entwickelten sich beblätterte Sprosse, die Wurzeln ausbilden konnten. Ähnliche Beobachtungen machte auch GRESSHOFF (1979) bei der Keimung von *Arabidopsis thaliana* Samen auf Glyphosat-haltigem Medium.

GRESSHOFF (1979) konnte durch Zugabe der aromatischen Aminosäuren die Glyphosat-induzierte Keimungshemmung bei *A.thaliana* aufheben. Deshalb wurde auch bei der Antherenkultur der Versuch unternommen, die Glyphosat-induzierte Hemmung der Embryonenbildung zu revertieren. Es wurden jeweils 100 Antheren der beiden *Nicotiana*-Arten auf 100 μM Glyphosatmedium kultiviert, das zusätzlich mit je 100 μM aromatischen Aminosäuren supplementiert war. Der Einfluß von Glyphosat war allerdings nicht revertierbar. Diese Beobachtungen wurden auch bei anderen pflanzlichen Systemen gemacht (DUKE & HOAGLAND, 1978). Der Grund dafür könnte sein, daß exogene aromatische Aminosäuren nicht immer das entsprechende Kompartiment erreichen können (COLE et al., 1980).

Da bei Glyphosatkonzentrationen $\geq 0,2\text{mM}$ keine Embryonenbildung beobachtet wurde, wurden zur Selektion Glyphosat-resistenter Linien Konzentrationen von 0,5 bzw. 1mM Glyphosat im Medium gewählt. Die Antheren wurden entweder unbehandelt oder nach UV-Bestrahlung kultiviert. Die Dauer der UV-Bestrahlung wurde so gewählt, daß die Behandlung zu 85% Letalmutationen führte. Einen Überblick über die Anzahl der kultivierten Antheren gibt Tabelle 4. Es kam in keinem Fall zu einer Bildung von Pflanzen.

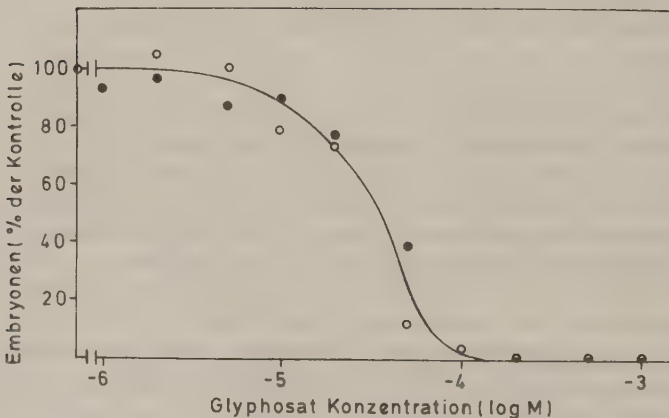


Abb. 10: Einfluß von Glyphosat auf die Bildung von Embryonen aus Mikrosporen von *Nicotiana tabacum* (—○—) und *N.sylvestris* (—●—).

Kulturbedingungen	Anzahl der kultivierten Antheren	gebildete Embryonen	Anzahl der Mikrosporen*
<i>N.tabacum</i> :			
0,5 mM Glyphosat	720	0	10800
1 mM Glyphosat	4670	0	70050
1 mM Glyphosat, UV	1790	0	4020
gesamt:	7180	0	84870
<i>N.sylvestris</i> :			
0,5 mM Glyphosat	2730	0	5469
1 mM Glyphosat	530	0	1060
gesamt:	3260	0	6520

Tab.4: Anzahl der kultivierten Antheren zur Selektion Glyphosat-resistenter Pflanzen.

*: Anzahl der Mikrosporen, die unter gleichen Kulturbedingungen auf Medium ohne Glyphosat Embryonen gebildet hätten.

2. Haploide Zellsuspensionskulturen von *N.tabacum*

Um schneller und einfacher eine größere Anzahl haploider Zellen auf Glyphosatresistenz zu untersuchen, wurde eine Zellsuspensionskultur aus dem Blattmaterial einer haploiden Pflanze angelegt. Die Etablierung der Suspensionskultur (GAMBORG & SHYLUK, 1981) erfolgte über 6 Wochen in LS-Medium (LINSMAIER & SKOOG, 1965). Um den Einfluß von Glyphosat auf das Wachstum der Zellkultur zu untersuchen, wurde die Frischgewichtszunahme der Kultur in Abhängigkeit verschiedener Glyphosatkonzentrationen im Kulturmedium gemessen (Abb.11). Der I_{50} -Wert der Frischgewichtszunahme wurde mit 70µM Glyphosat bestimmt. Zur Selektion Glyphosat-resistenter Zellen wurde die Suspensionskultur auf Agarmedium plattiert, das 1mM Glyphosat enthielt. Es konnten keine Glyphosat-toleranten Zelllinien selektiert werden, alle ausplattierten Zellen wurden nach kurzer Zeit braun und starben ab. Kontrollkulturen entwickelten sich auf Glyphosat-freiem Medium weiter und ließen sich zu intakten Pflanzen regenerieren.

Parallel wurde der Versuch unternommen. Glyphosat-tolerante Zellsuspensionskulturen durch Adaptation zu erhalten. Dazu wurde die Glyphosatkonzentration im Kulturmedium schrittweise von 100µM auf 1mM gesteigert. Nach 6

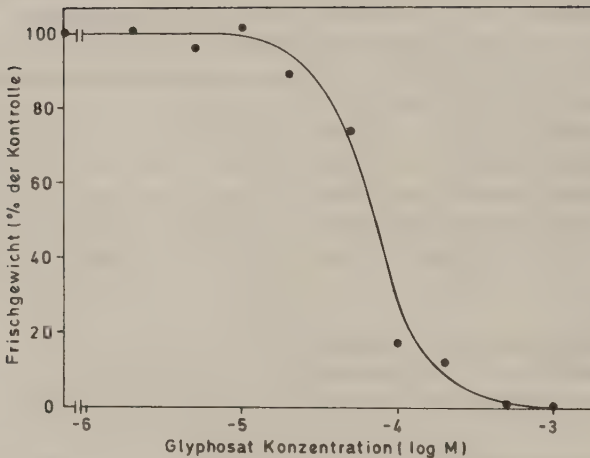


Abb.11: Frischgewichtszunahme einer haploiden Zellsuspensionskultur von *N. tabacum* in Abhängigkeit von der Glyphosatkonzentration im Kulturmedium. Das Frischgewicht wurde nach 3 Tagen Kultur bestimmt.

Monaten unterschied sich die adaptierte Kultur im Wachstumsverhalten nicht mehr von Kontrollkulturen. Die Bestimmung der EPSP-Synthase Aktivität ergab eine 5-fache Steigerung der Enzymaktivität gegenüber einer Kontrolle. Die Enzymaktivität ließ sich durch 1mM Glyphosat vollständig inhibieren. Auf eine weitere Charakterisierung der Kultur wurde verzichtet, da der Toleranzmechanismus, beruhend auf einer Überproduktion der Glyphosat-sensitiven EPSP-Synthase, bereits bei verschiedenen anderen Zellsuspensionskulturen untersucht worden war (Zusammenstellung bei AMRHEIN, 1986). Der Versuch, aus der Zellsuspensionskultur Pflanzen zu regenerieren, mißlang.

Während der Fertigstellung der vorliegenden Arbeit wurde zum ersten Mal von der erfolgreichen Regeneration einer Glyphosat-toleranten *N. tabacum* Zellkultur berichtet (DYER et al., 1988). Die Toleranz beruhte ebenfalls auf einer Überproduktion der Glyphosat-sensitiven EPSP-Synthase, die die Zellkultur in die Lage versetzte, 3mM Glyphosat im Kulturmedium zu tolerieren. Auch nach der Regeneration fertiler Pflanzen blieb der Glyphosat-tolerante Phänotyp erhalten.

3. Kultur haploider Mesophyllzellprotoplasten von *N.tabacum*

Die mikroskopische Untersuchung der angelegten Zellsuspensionskultur zeigte, daß in der Kultur die Zellen nicht einzeln, sondern in Aggregaten bis zu 100 Zellen vorlagen. Die Zellen solcher Aggregate können sich gegenseitig beeinflussen. Zum Beispiel können Zellen, die im Innern liegen, durch äußere Zellen gegen Glyphosat abgeschirmt werden.

Um gegenseitige Beeinflussungen bei der Induktion von Glyphosattoleranz auszuschließen, wurden aus dem Blattmaterial haploider Tabakpflanzen Protoplasten isoliert (BINDING, 1975). Die Protoplasten wurden in Agarose (FMC SeaPlaque; Biozym Diagnostik GmbH, Hameln) eingebettet (Konzentration: 5×10^4 Protoplasten/ml) und nach der "Bead Type"-Technik (SHILITO et al., 1983) in V47-Medium (BINDING, 1974) kultiviert. Bei dieser Technik werden die Agarosestückchen in Flüssigmedium inkubiert. Der Vorteil ist, daß ein Austausch des Mediums, der alle zwei Wochen erfolgte, schnell und einfach durchgeführt werden kann, ohne die Weiterentwicklung der Protoplasten zu stören.

Die Teilungsrate der auf diese Weise kultivierten Protoplasten betrug durchschnittlich 30%. Die Bestimmung der Teilungsrate erfolgte nach 16 Tagen durch Auszählung der gebildeten Mikrokalii. Der Einfluß von Glyphosat auf die Teilungsrate ist in Abb.12 dargestellt. Es wurden ca. 10^7 Protoplasten, die zum Teil mit UV-Licht behandelt wurden, in 1mM Glyphosat-haltigem Medium inkubiert. Es konnte keine einzige teilungsfähige Zellinie selektiert werden.

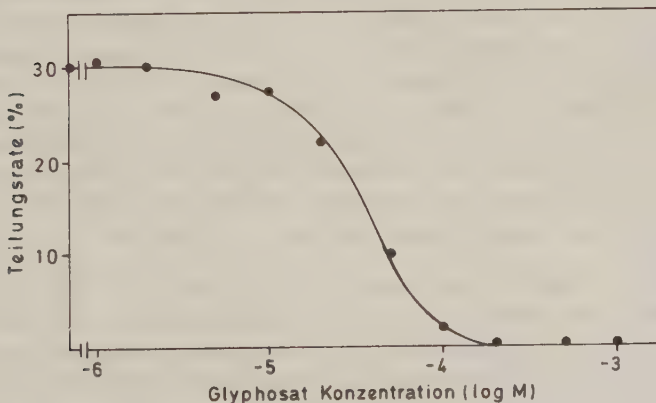


Abb.12: Einfluß von Glyphosat auf die Teilungsrate haploider Mesophyllprotoplasten von *N.tabacum*. Die Teilungsrate wurde nach 16 Tagen bestimmt.

V. Diskussion

Die gestiegenen Kosten bei der ungezielten Suche nach neuen Herbiziden mit selektiver Wirkung machten es in den letzten Jahren erforderlich, sich nach alternativen Methoden umzusehen, um Selektivität beim Einsatz von Herbiziden zu erreichen. So ist es denkbar, daß, basierend auf den Ergebnissen der Grundlagenforschung, gezielt für bestimmte Enzyme Hemmstoffe synthetisiert werden, die als Herbizide eingesetzt werden könnten. Eine weitere Alternative ist die Züchtung herbizidresistenter Kulturpflanzen. Die Möglichkeiten der klassischen Pflanzenzüchtung sind hier allerdings begrenzt und beschränken sich auf die Einkreuzung von Resistenzen aus nahe verwandten Wildkräutern. Zur Erzeugung von Glyphosat-resistenten Nutzpflanzen kommt diese Möglichkeit nicht in Betracht, da in der Natur bisher keine Glyphosat-resistenten Pflanzen aufgetreten sind.

Auch der im Anhang dieser Arbeit beschriebene Versuch, über die Kultur von Haplonten Glyphosat-resistente Pflanzen zu erzeugen, brachte nicht den gewünschten Erfolg. Sicherlich ist die Anzahl von 10^4 kultivierten Antheren (entsprechend ca. 10^5 Mikrosporen) nicht ausreichend, um statistisch abzusichern, daß es keine Glyphosatresistenz bei Pflanzen gibt. Aber auch durch die Kultur einer größeren Anzahl haploider Zellen über Suspensionskulturen und Protoplastenkulturen konnten keine Glyphosat-resistenten Zelllinien selektiert werden.

Deshalb konzentrierte sich in den letzten Jahren die Forschung auf den Angriffspunkt des Herbizids, die EPSP-Synthase, die zur Zeit wohl das am besten untersuchte Enzym der Aromatenbiosynthese ist. Dahinter steht die Überlegung, daß es vielleicht möglich ist, auf die Erkenntnissen der Grundlagenforschung aufzubauen und mit Hilfe der modernen Gentechnologie Glyphosat-resistente Nutzpflanzen zu erzeugen. Zum einen besteht die Möglichkeit, Glyphosatresistenz vermittelnde *aroA*-Gene aus Bakterien direkt in Pflanzen einzuführen. Zum anderen könnte nach der Identifizierung der Mutation in bakteriellen Resistenzgenen der Versuch unternommen werden, durch *in vitro* Mutagenese die entsprechende Stelle im Pflanzengen zu verändern.

Unerläßlich für diese Vorgehensweise ist die Sequenzierung und der Vergleich einer Reihe von *aroA*-Genen aus Glyphosat-sensitiven und -resistenten Organismen. In der vorliegenden Arbeit wurde das *aroA*-Gen aus *Klebsiella pneumoniae* isoliert und sequenziert. *K.pneumoniae* wurde deshalb ausgewählt, weil die EPSP-Synthase aus diesem Bakterium bereits durch umfangreiche proteinchemische Untersuchungen charakterisiert wurde (STEINRÜCKEN & AMRHEIN, 1984a+b). Darüber hinaus existiert eine Glyphosat-resistente Mutante, die eine Glyphosat-insensitive EPSP-Synthase besitzt (SCHULZ et al.,

1984; SOST et al., 1984). Das entsprechende *aroA*-Gen wurde in der vorliegenden Arbeit ebenfalls sequenziert und mit der Wildtypsequenz verglichen.

1. Identifizierung und Expression der *aroA*-Gene aus *Klebsiella pneumoniae*

Die Identifizierung des *aroA*-Gens erfolgte über DNA-DNA-Hybridisierung mit dem *aroA*-Gen aus *E.coli*. Das *aroA*-Gen aus *E.coli* wurde deshalb ausgewählt, weil es zum einen kloniert vorlag (ROGERS, unveröffentlicht), zum anderen, weil aufgrund der Verwandtschaft von *E.coli* zu *K.pneumoniae* - beide gehören zu den *Enterobacteriaceae* - die Wahrscheinlichkeit sehr groß war, das Gen auf diese Weise zu identifizieren. Es wurden Hybridisierungssignale festgestellt (Abb.2), die aufgrund der hohen Hybridisierungstemperatur (65°C) spezifisch sein mußten.

In Zellkulturen von *Petunia hybrida* konnte gezeigt werden, daß Glyphosat-toleranz durch die Amplifikation des *aroA*-Gens erreicht werden kann (SHAH et al., 1986). Deshalb wurde die Intensität der Hybridisierungssignale gleicher Mengen DNA aus Wildtyp und Mutante miteinander verglichen. Es ergaben sich keine Intensitätsunterschiede, so daß davon ausgegangen werden kann, daß das *aroA*-Gen in der Mutante nicht amplifiziert vorliegt. Die identischen spezifischen Aktivitäten der EPSP-Synthase in Rohextrakten beider Stämme (Tab.2) sind ebenfalls ein Indiz für die gleiche Kopienzahl der Gene.

Die DNA wurde mit verschiedenen Restriktionsenzymen geschnitten und die Größe der hybridisierenden DNA-Banden bestimmt (Tab.1). Wurde die DNA mit den Restriktionsenzymen *Cla* I und *Sma* I geschnitten, hybridisierten zwei DNA-Fragmente. Das bedeutet, daß für diese Enzyme im *aroA*-Gen jeweils eine Schnittstelle vorhanden ist. Für *Pst* I existieren sogar zwei Schnittstellen, da hier drei Banden hybridisierten. Der Größenvergleich der hybridisierenden Banden von Wildtyp- und Mutanten-DNA, die mit den gleichen Restriktionsenzymen geschnitten wurden, ergab keine Unterschiede. Das ist nicht weiter verwunderlich, da mit der relativ groben Methode der Agarosegel-Elektrophorese kleinere Größenunterschiede nicht feststellbar sind. Auch ein Basenaustausch im Gen läßt sich nur dann nachweisen, wenn durch die Mutation eine neue Restriktionsschnittstelle entsteht oder eine bestehende Schnittstelle wegfällt.

Zur Klonierung der *aroA*-Gene wurden Lambda-Genbanken angelegt. Die Restriktion der *Klebsiella*-DNA erfolgte mit *Eco* RI, da durch die Hybridisierungsexperimente sichergestellt war, daß dieses Enzym das *aroA*-Gen nicht zerschneidet. Nach statistischer Abschätzung der Vollständigkeit der Genbanken, wurden *aroA*-positive Klone über Plaquefilter-Hybridisierung identifi-

ziert. Sowohl für den Wildtyp als auch für die Mutante konnte jeweils ein positiver Klon isoliert werden.

Da Klonierungsartefakte durch Hybridisierung nicht erfaßt werden können, wurden die klonierten *aroA*-Gene in *E.coli* exprimiert. Die Subklonierung erfolgte im Plasmid pBR322 und nicht in einem speziellen Expressionsvektor. Aufgrund vergleichender Untersuchungen prokaryotischer Promotorsequenzen (ROSENBERG & COURT, 1979; HAWLEY & McCLURE, 1983) wurde davon ausgegangen, daß der Promotor des *Klebsiella aroA*-Gens auch von der RNA-Polymerase aus *E.coli* erkannt wird. Voraussetzung dafür ist, daß der Promotor bei der Subklonierung nicht verloren geht. Bei allen bisher untersuchten Prokaryonten befindet sich das *aroA*-Gen auf einem gemischten Operon hinter dem *serC*-Gen, einem Gen der Serin-Biosynthese, welches für das Enzym 3-Phosphoserin Aminotransferase (PSAT) codiert (HOISETH & STOCKER, 1985; DUNCAN & COGGINS, 1986). Auch für *K.pneumoniae* gab es vor der Klonierung in der vorliegenden Arbeit Indizien dafür, daß das *aroA*-Gen Bestandteil dieses Operons ist. So konnte bei einer EPSP-Synthase überproduzierenden Mutante, die auf Glyphosat-haltigem Medium isoliert wurde, gezeigt werden, daß auch die PSAT überproduziert wird (PIPKE & AMRHEIN, unveröffentlicht). Da das *aroA*-Gen das zweite Gen dieses Operons ist, liegt der Promotor ca. 1200 bp stromaufwärts des Startcodons, so daß zur Expression des *aroA*-Gens das gesamte Operon subkloniert werden mußte. Dafür wurden Restriktionskarten der Lambdaklone erstellt und entsprechend große DNA-Fragmente in das Plasmid umklontiert (Abb.5).

Als Rezipient mußte ein *E.coli* Stamm gewählt werden, der keine eigene EPSP-Synthase Aktivität besitzt und damit auch nicht auf Minimalmedium wachsen kann. Ein solcher Stamm, AB2829, wurde 1966 von WOOD beschrieben. AB2829 erwies sich allerdings als schlechter Rezipient für Transformations-experimente, da er ein intaktes Restriktionssystem besitzt, das ihn vor Fremd-DNA schützt. Deshalb wurde über P1-Transduktion ein *hsdR*⁻ Stamm aus AB2829 konstruiert, der eine 10³- bis 10⁴-fach erhöhte Transformations-rate gegenüber dem Ausgangsstamm zeigte.

Der konstruierte Stamm, DSK8, wurde mit den Plasmidkonstrukten transformiert. Die Transformanten konnten auf Minimalmedium wachsen. Diese Beobachtung läßt sich nur durch eine Komplementation der fehlenden EPSP-Synthase Aktivität der Rezipientenstämme durch die Plasmid-codierten Enzyme erklären. Alle Transformanten besaßen außerdem die Fähigkeit, auf 10mM Glyphosat im Medium zu wachsen. Für die Stämme, die das Gen für die Glyphosat-resistente EPSP-Synthase enthielten, war dieses Ergebnis zu erwarten. Aber auch die Stämme, die das Gen für die sensitive EPSP-Synthase aus *K.pneumoniae* trugen, zeigten Toleranz gegenüber Glyphosat. Die Toleranz beruht in diesen Stämmen auf einer Amplifikation des *aroA*-Gens, die durch

die Kopienzahl des Plasmids in der Zelle erreicht wird. Eine vergleichbare Glyphosatoleranz wurde auch bei der Klonierung des *E.coli* *aroA*-Gens in pBR322 beobachtet (ROGERS et al., 1983). Die Transformanten zeigten hier eine 17-fach erhöhte EPSP-Synthase Aktivität und eine 8-fach höhere Toleranz gegenüber Glyphosat. Auch in höheren Pflanzen führt die Amplifikation eines *aroA*-Gens, das für eine Glyphosat-sensitive EPSP-Synthase codiert, zu Glyphosatoleranz. So besitzen Zellsuspensionskulturen von *Petunia hybrida*, die an Glyphosat im Kulturmedium adaptiert wurden, ca. 20 Kopien des *aroA*-Gens (SHAH et al., 1986).

Um Hinweise auf eine Überproduktion der EPSP-Synthase in den Plasmid tragenden Stämmen zu erhalten, wurde die Enzymaktivität in den Rohextrakten bestimmt (Tab.2). Alle Stämme, die das *aroA*-Gen auf einem Plasmid trugen, zeigten eine ca. 20-fach gesteigerte EPSP-Synthase Aktivität gegenüber *Klebsiella*. Die spezifischen Aktivitäten schwankten zwischen 8 und 18 nkat/mg Protein. Auch bei mehrfacher Bestimmung der Aktivität in denselben Klonen wurden Schwankungen festgestellt. Ursache dürfte die nicht konstante Kopienzahl der Plasmide in einer Zelle sein (CLEWELL & HELINSKI, 1972). Im Rahmen dieser Schwankungen hatte die Orientierung der Fragmente im Plasmid keinen Einfluß auf die Enzymaktivität. Das ist ein Hinweis darauf, daß für die Expression der EPSP-Synthase ein Fragment-eigener Promotor, also ein *Klebsiella* Promotor, benutzt wurde. Daß das *aroA*-Gen auch über einen Promotor des Plasmids pBR322 abgelesen werden kann, beobachteten DUNCAN & COGGINS (1986) bei der Subklonierung des *E.coli* Gens. Die spezifische EPSP-Synthase Aktivität war in diesen Klonen allerdings 100-fach geringer.

Die proteinchemischen Eigenschaften, speziell die Empfindlichkeit der EPSP-Synthasen gegenüber Glyphosat, wurden durch die Klonierung nicht verändert. Das klonierte *aroA*-Gen aus *K.pneumoniae* K1 codierte auch in *E.coli* für eine Glyphosat-resistente EPSP-Synthase, deren Aktivität durch 5mM Hemmstoff nicht inhibierbar war. Die Aktivität der in *E.coli* exprimierten EPSP-Synthase aus *K.pneumoniae* wt ließ sich dagegen durch 5mM Glyphosat vollständig hemmen. Bei allen Bestimmungen war die spezifische Enzymaktivität in Klonen mit Glyphosat-resistenter EPSP-Synthase etwas niedriger. Als Grund muß die geringere Stabilität des resistenten Enzyms angesehen werden, die schon bei der Reinigung und Charakterisierung festgestellt worden war (SOST et al., 1984).

Die durchgeführten Klonierungs- und Expressionsexperimente liefern einen weiteren Beweis dafür, daß die EPSP-Synthase *in vivo* der Hauptangriffspunkt des Herbizids Glyphosat ist, da dieses Enzym in amplifizierter Form dem Bakterium *E.coli* Glyphosatoleranz vermitteln kann. Dabei kann die Toleranz sowohl von einer Glyphosat-resistenten, als auch von einer Glyphosat-sensitiven, amplifizierten EPSP-Synthase vermittelt werden.

2. Struktur des *aroA*-Gens aus *Klebsiella pneumoniae* wt

Nach der Klonierung und der Expression wurde die DNA-Sequenz des *aroA*-Gens aus *Klebsiella pneumoniae* wt bestimmt. Der sequenzierte Bereich umfaßte 1565 bp. Die Sequenzierung erfolgte mit Hilfe der Enzym katalysierten Dideoxy-Kettenabbruch-Methode nach MESSING (1983). Zur Absicherung der ermittelten Sequenz wurden zum einen beide DNA-Stränge sequenziert. Darüber hinaus wurde die Originalvorschrift in zwei Punkten variiert: Die Sequenzierungsreaktion erfolgt üblicherweise mit dem Klenow-Fragment der DNA-Polymerase I aus *E.coli* (KORNBERG, 1980). In Abwandlung wurde zusätzlich die T7-DNA-Polymerase eingesetzt. Mit Hilfe dieses Enzyms wurde eine gleichmäßigere Verteilung der radioaktiven Markierung in den gebildeten DNA-Fragmenten erreicht (TABOR & RICHARDSON, 1987). Dadurch wurde die Bestimmung der Basensequenz über einen längeren Bereich erleichtert. In einigen Reaktionsansätzen wurde dGTP durch 7-deaza-dGTP ersetzt. Dadurch konnte die Bildung intramolekularer Sekundärstrukturen, die das Laufverhalten der gebildeten DNA-Moleküle auf den Sequenzierungsgelen beeinflusst, verhindert werden (MIZUSAWA et al., 1986).

Der sequenzierte Bereich enthielt einen offenen Leserahmen von 1284 Nukleotiden (Abb.7). Sequenzvergleiche zeigten 78% Homologie zu den *aroA*-Genen aus *E.coli* und *S.typhimurium*. Aufgrund der großen Homologie muß davon ausgegangen werden, daß es sich bei dem offenen Leserahmen um das *aroA*-Gen aus *K.pneumoniae* handelt. Vor dem *aroA*-Gen wurden 99 bp eines weiteren offenen Leserahmens sequenziert, die 80% Homologie zum entsprechenden Abschnitt des *serC*-Gens aus *E.coli* aufwiesen. Auf dem 72 bp langen Abschnitt zwischen beiden Genen konnte keine Sequenz identifiziert werden, die der Konsensussequenz prokaryotischer Promotoren glich oder ähnlich war (vgl. z.B.: HAWLEY & McCURE, 1983). Stattdessen enthielt dieser Abschnitt eine GC-reiche, invertierte Sequenzwiederholung, gefolgt von einem T-reichen Abschnitt, der typisch für die rho-unabhängige Transkriptionstermination in *E.coli* ist (ROSENBERG & COURT, 1979). Diese Strukturen wurden auch für das *serC-aroA*-Operon aus *E.coli* beschrieben (DUNCAN & COGGINS, 1986). Alle ermittelten Daten lassen den Analogieschluß zu, daß auch in *K.pneumoniae* das *serC*-Gen und das *aroA*-Gen ein Operon bilden. Ein abschließender Beweis kann aber nur durch die vollständige Sequenzierung des *serC*-Gens und eine Identifizierung der Promotorsequenz des Operons durch S1-Nuklease Kartierung (BERK & SHARP, 1977) erbracht werden.

Die Zusammenfassung von Genen in einem Operon erlaubt die koordinierte Expression dieser Gene über die Induktion oder die Repression des gesamten Operons. Aus diesem Grund sind fast ausschließlich Gene eines gemeinsamen Stoffwechselweges in einem Operon angeordnet. Beispiele sind das *trp*-, das *his*- oder das *lac*-Operon aus *E.coli* (KNIPPERS, 1982). Alle bisherigen Unter-

suchungen deuten darauf hin, daß das *serC-aroA*-Operon nicht regulierbar ist. Sowohl die EPSP-Synthase als auch die PSAT werden konstitutiv gebildet (TRIBE et al., 1976; McKITRICK & PIZER, 1980). Dennoch stellt sich die Frage nach dem physiologischen Sinn der Anordnung eines Gens des Shikimisäureweges und eines Gens der Serinbiosynthese auf einem gemeinsamen Operon. Die Endprodukte beider Stoffwechselwege, Serin und Chorismat, sind Substrate des Biosyntheseweges von Enterochelin, einem Ionophor, das zur Aufnahme von Eisen aus der Umgebung benötigt wird (ROSENBERG & YOUNG, 1974). Eisenmangel führt durch Geninduktion zu einer verstärkten Synthese von Enterochelin (LAIRD et al., 1980), und damit zu einer Entleerung der Pools von Chorismat und Serin in der Bakterienzelle. Die Anordnung des *serC*-Gens und des *aroA*-Gens auf einem Operon könnte eine koordinierte Auffüllung dieser Pools gewährleisten.

3. Vergleich der EPSP-Synthase Sequenz aus *K.pneumoniae* mit den bisher veröffentlichten Sequenzen

Ausgelöst durch die Beobachtung, daß der molekulare Angriffsort des Herbizids Glyphosat die EPSP-Synthase ist (STEINRÜCKEN & AMRHEIN, 1980), wurde dieses Enzym in den letzten Jahren aus verschiedenen Organismen isoliert und charakterisiert (Literaturzusammenstellung z.B. bei KISHORE & SHAH, 1988).

Auch die dazugehörigen Gene sind bereits in acht Organismen kloniert und sequenziert und die Aminosäuresequenzen daraus abgeleitet worden. Der Übersichtlichkeit halber sind die Daten aller bisher publizierten EPSP-Synthase Sequenzen in Tab.5 zusammengefaßt und werden den in dieser Arbeit ermittelten Daten der *K.pneumoniae* Sequenz gegenübergestellt.

Es wurde ebenfalls ein Vergleich auf Aminosäureebene durchgeführt (Abb.13). Dieser Vergleich erlaubt es, den Grad der Übereinstimmung zwischen den Sequenzen abzuschätzen und streng konservierte Regionen ausfindig zu machen.

Organismus	Länge (AS)	Molekulargewicht (Dalton)	Referenz
Pilze^a:			
<i>S.cerevisiae</i>	462	174555	DUNCAN et al. (1987)
<i>A.nidulans</i>	451	175101	CHARLES et al. (1986)
Pflanzen^b:			
<i>P.hybrida</i>	444	47563	GASSER et al. (1988)
<i>L.esculentum</i>	444	47544	GASSER et al. (1988)
<i>A.thaliana</i>	444	47556	KLEE et al. (1987)
Bakterien:			
<i>B.pertussis</i>	442	46688	MASKELL et al. (1988)
<i>E.coli</i>	427	46112	DUNCAN et al. (1984)
<i>S.typhimurium</i>	427	46100	STALKER et al. (1985)
<i>K.pneumoniae</i>	427	45976	diese Arbeit

Tab.5: Zusammenstellung der bisher publizierten EPSP-Synthase Sequenzen.

^a: Aufgeführt ist nur die Länge der EPSP-Synthase Domäne, aber das Molekulargewicht des gesamten *arom*-Komplexes.

^b: Länge und Molekulargewicht der reifen Proteine.

Abb.13: Vergleich der EPSP-Synthase Sequenz aus *K.pneumoniae* mit den bisher veröffentlichten Sequenzen. Identische Aminosäuren in mindestens sechs Sequenzen sind durch Kästen gekennzeichnet, Bindestriche kennzeichnen Deletionen.

Der Grad der Übereinstimmung wurde dazu benutzt, den phylogenetischen Stammbaum von GASSER et al. (1988) zu erweitern (Abb.14). Nicht weiter erstaunlich ist die große Homologie der Sequenz von *K.pneumoniae* mit denjenigen von *E.coli* und *S.typhimurium* (88%), da diese Bakterien zur Familie der *Enterobacteriaceae* gehören. Immerhin noch 54% Homologie besteht zu den pflanzlichen EPSP-Synthasen, die geringste Übereinstimmung besteht zu den pilzlichen Sequenzen (44%). Obwohl Pflanzen und Pilze eukaryotische Organismen sind, besteht untereinander nur 38% Homologie. Das bedeutet, daß, ausgehend von einer "Ur-EPSP-Synthase", die Abtrennung der pilzlichen Sequenzen in der Evolution eher stattgefunden haben muß, als die Trennung der bakteriellen und pflanzlichen EPSP-Synthasen. Diese Annahme wird unterstützt durch die signifikanten Unterschiede in den Proteinstrukturen. Während bakterielle und pflanzliche EPSP-Synthasen monomere, lösliche Proteine sind, sind die pilzlichen Sequenzen Bestandteil eines Multienzymkomplexes, dem *arom*-Komplex, der insgesamt 5 Aktivitäten des Shikimisäureweges trägt.

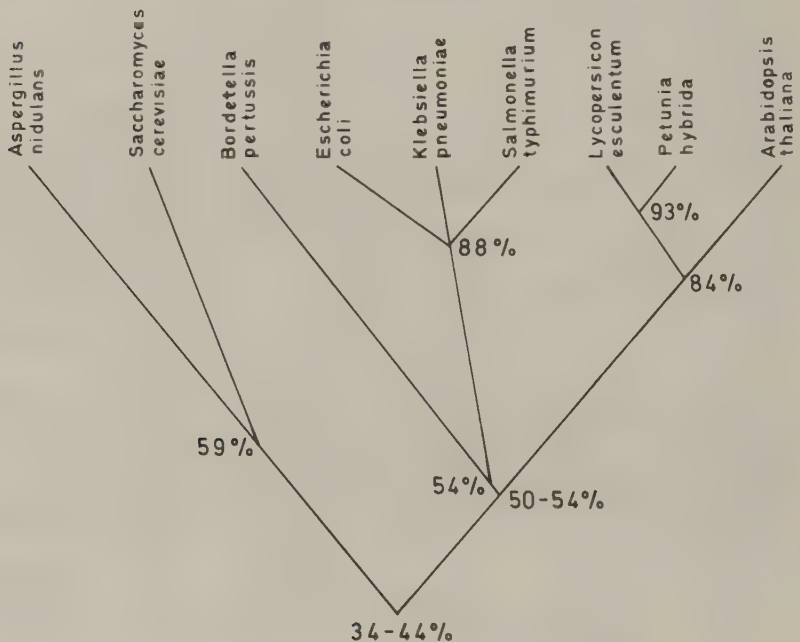


Abb.14: Phylogenetischer Stammbaum der EPSP-Synthase (erweitert nach GASSER et al., 1988). An den Verzweigungsstellen ist der Grad der Homologie zwischen den Aminosäuresequenzen dargestellt.

Nicht nur die EPSP-Synthase Domäne, sondern auch die übrigen 4 Domänen des *arom*-Komplexes aus *Saccharomyces cerevisiae* und *Aspergillus nidulans* weisen Homologien zu den entsprechenden Enzymsequenzen aus *E.coli* auf (CHARLES et al., 1986; Duncan et al., 1987). Diese Mosaikstruktur führte zu der Annahme, daß der *arom*-Komplex im Laufe der Evolution durch die Fusion *E.coli* ähnlicher Urgene des Shikimisäureweges entstanden ist. Ähnliche Beobachtungen wurden auch bei anderen multifunktionellen Proteinen gemacht (HARDIE & COGGINS, 1986). Unter der Voraussetzung, daß die Genfusionshypothese richtig ist, muß man erwarten, daß die einzelnen funktionellen Domänen eine gewisse strukturelle Autonomie besitzen und deshalb z.B. durch limitierte Proteolyse voneinander getrennt werden können. Durch tryptische Verdauung des *arom*-Komplexes aus *Neurospora crassa* erhielten COGGINS et al. (1985) ein stabiles Peptid von 68000 Dalton, das die Enzymaktivitäten der Shikimat-Dehydrogenase und der 3-Dehydrochinat-Dehydratase besaß. Durch kombinierte Verdauung mit Trypsin und Chymotrypsin konnte ein 74000 Dalton großes Fragment isoliert werden, das EPSP-Synthase Aktivität besaß. Darüber hinaus existieren Untersuchungen an *N.crassa* Mutanten, denen durch Punktmutation einzelne Enzymaktivitäten des *arom*-Komplexes fehlen (GILES et al., 1967; RINES et al., 1969; CASE & GILES, 1971), die ebenfalls für das Mosaikstrukturmodell des *arom*-Komplexes sprechen.

Alle bisher durchgeführten Untersuchungen über die Kompartimentierung der pflanzlichen EPSP-Synthasen weisen auf eine Lokalisation dieses Enzyms im Chloroplasten hin (Zusammenstellung bei AMRHEIN, 1986). Eine Hypothese über die Herkunft von Plastiden besagt, daß sie von endosymbiontischen Prokaryonten abstammen (MARGULIS, 1970). Mit Hilfe dieser Hypothese läßt sich die relativ hohe Homologie pflanzlicher und bakterieller EPSP-Synthasen erklären. Pflanzliche EPSP-Synthasen werden allerdings nicht vom Chloroplastengenom codiert, sondern sind kerncodierte Proteine, die als höhermolekulare Vorläufer im Cytoplasma synthetisiert werden (SHAH et al., 1986; KLEE et al, 1987; Gasser et al., 1988). Das Vorläuferprotein wird in das Stroma des Chloroplasten transportiert, wo durch proteolytische Abspaltung des N-terminalen "Transit"-peptids das reife Protein entsteht (DELLA-CIOPPA et al., 1986). Folgt man der Endosymbiontentheorie, muß das pflanzliche *aroA*-Gen im Laufe der Evolution aus dem Chloroplasten in den Nukleus gewandert sein (WEEDEN, 1981). Kürzlich wurde eine ähnliche Hypothese auch für die Evolution der plastidären, kerncodierten Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase aus Tabak aufgestellt (SHIH et al., 1986).

Schwierigkeiten bereitet die phylogenetische Einordnung der EPSP-Synthase aus *Bordetella pertussis*. Systematisch gehört der Erreger des Keuchhustens zur Familie der *Brucellaceae*, einer Gruppe gramnegativer, unbeweglicher, stäbchenförmiger Bakterien. Trotz der nahen systematischen Verwandtschaft zu den *Enterobacteriaceae* findet man nur 54% Homologie, wenn man die EPSP-Synthasen miteinander vergleicht. Damit besteht hier die gleiche Verwandtschaft wie zu den pflanzlichen Enzymen.

Betrachtet man nicht die Gesamthomologie der verschiedenen EPSP-Synthasen, sondern vergleicht man die Sequenzen bestimmter Abschnitte des Polypeptids, so lassen sich größere Bereiche identifizieren, die in allen Taxa nahezu identisch sind (Abb.13). Aufgrund der langsamen Evolution besitzen diese Abschnitte möglicherweise funktionelle Bedeutung.

Aufgrund der anionischen Natur der Substrate S3P und PEP forderte STEINRÜCKEN (1982), daß sich im aktiven Zentrum der EPSP-Synthase Aminosäuren mit positiv geladenen Seitenketten befinden müssen. Ein für die Enzymaktivität interessanter, konservierter Bereich ist daher der Bereich von Leu-18 bis Leu-34, da er sowohl ein Lysin in Position 22 als auch ein Arginin in Position 27 enthält. Durch Modifikation mit gruppenspezifischen Reagenzien konnten sowohl Lys-22 (TREFFER, 1987; HUYNH et al., 1988a) als auch Arg-27 (NEHLS-SAHABANDU, 1987; PADGETTE et al., 1988a) in der EPSP-Synthase aus *E.coli* bzw. *P.hybrida* markiert werden. Ein Schutz vor der Modifikation und dem damit verbundenen Verlust der enzymatischen Aktivität konnte durch den Einsatz der Substrate bzw. von Glyphosat erreicht werden. Der Austausch von Lys-22 durch Alanin oder Glutamat führte ebenfalls zu einem Verlust der enzymatischen Aktivität im *P.hybrida* Enzym (HUYNH et al., 1988b). Diese Experimente deuten darauf hin, daß der Bereich um Lys-22 und Arg-27 einen Teil des aktiven Zentrums der EPSP-Synthase bildet.

Darüber hinaus wurden Evidenzen dafür gesammelt, daß auch andere Aminosäuren, wie Cystein, Histidin, Glutaminsäure oder Tryptophan, für die katalytische Aktivität der EPSP-Synthase erforderlich sind (PADGETTE et al., 1988b; HUYNH, 1987; HUYNH, 1988; KLOOS, 1988). Zum einen ist die Position dieser Aminosäuren aber noch nicht eindeutig geklärt, zum anderen befinden sie sich teilweise nicht in konservierten Bereichen. Eine abschließende Strukturaufklärung des katalytischen Zentrums kann nur durch die Kristallisation und Röntgenstrukturanalyse der gereinigten EPSP-Synthase erfolgen. Hochgereinigte Präparationen der EPSP-Synthase bilden allerdings instabile Enzympopulationen aus (SCHULZ, 1986). Die einzelnen Konformationszustände lassen sich zwar durch geeignete Chromatographiemethoden voneinander trennen, können sich allerdings auch wieder ineinander umwandeln. Aus diesem Grund ist es bisher noch nicht gelungen, geeignete Kristalle zu züchten, die eine hochauflösende Röntgenstrukturanalyse zulassen (ABDEL-MEGUID, 1985).

4. Struktur der Glyphosat-resistenten EPSP-Synthase

Ein ebenfalls interessanter, streng konservierter Bereich befindet sich zwischen Leu-90 und Leu-102. Dieser Peptidabschnitt scheint nicht zum katalytischen Zentrum der EPSP-Synthase zu gehören. Es gibt keine Berichte über eine chemische Modifikation der einzigen, positiv geladenen Aminosäure in diesem Bereich, Arg-100, die zu einer Inaktivierung der enzymatischen Aktivität geführt hätte. Mutationen in diesem Bereich führen allerdings zu einer Veränderung in der Bindungsaffinität des Enzyms zu Glyphosat. So konnte eine Glyphosat-tolerante Mutante von *S.typhimurium* isoliert werden, bei der Pro-101 durch Serin ausgetauscht war (STALKER et al., 1985). Die veränderte EPSP-Synthase besaß einen 9-fach höheren I_{50} -Wert für Glyphosat gegenüber dem Wildtypenzym.

In der vorliegenden Arbeit wurde das *aroA*-Gen einer Glyphosat-resistenten Mutante von *K.pneumoniae* isoliert und sequenziert. Durch den Vergleich mit der *aroA*-Gensequenz des Wildtyps wurde ein einziger Basenaustausch an der Position 287 festgestellt (Abb.8). Die Punktmutation führt in der abgeleiteten Aminosäuresequenz zu einem Austausch von Gly-96 durch Alanin. Die Mutation liegt damit genau in der Mitte des konservierten Bereiches. Die veränderte EPSP-Synthase besitzt einen über 1000-fach höheren I_{50} -Wert für Glyphosat gegenüber dem Wildtyp (SCHULZ et al., 1985) und ist das gegenüber Glyphosat resistenste Enzym, das bisher charakterisiert wurde ($K_I=8\text{mM}$; SCHULZ, 1986). Inwiefern weitere Mutationen in dem Bereich von Leu-90 bis Leu-102 zu Glyphosat-resistenten EPSP-Synthasen führen, ist bisher nicht untersucht. Die DNA-Sequenz des *aroA*-Gens einer Glyphosat-toleranten *E.coli* -EPSP-Synthase, die von KISHORE et al. (1986) proteinchemisch charakterisiert wurde ($K_I=4,1\text{mM}$), wurde bisher nicht publiziert. Interessant ist ebenfalls die Frage, ob entsprechende Mutationen auch in pflanzlichen *aroA*-Genen zu Glyphosat-resistenten EPSP-Synthasen führen.

Neben der erhöhten Glyphosatresistenz der EPSP-Synthase aus *K.pneumoniae* K1 wurden bei der proteinchemischen Charakterisierung des Enzyms weitere signifikante Unterschiede zum Wildtypenzym festgestellt (SOST, 1984; SOST et al., 1984; SCHULZ, 1986). Einige Charakteristika sind in Tabelle 6 zusammengestellt.

	Glyphosat-sensitive EPSP-Synthase	Glyphosat-insensitive EPSP-Synthase
apparentes Molekulargewicht, SDS-Gelelektrophorese (Dalton)	42500	43000
Isoelektrischer Punkt (pH)	4,6	4,1
Apparente K_M -Werte (μM)		
PEP	9	140
S3P	45	193
Apparenter K_I -Wert (μM)		
Glyphosat	1	8000

Tab.6: Charakteristika der Glyphosat-sensitiven und -insensitiven EPSP-Synthase aus *K.pneumoniae* (SOST et al., 1984); K_I -Werte aus: SCHULZ (1986); STEINRÜCKEN & AMRHEIN (1984b).

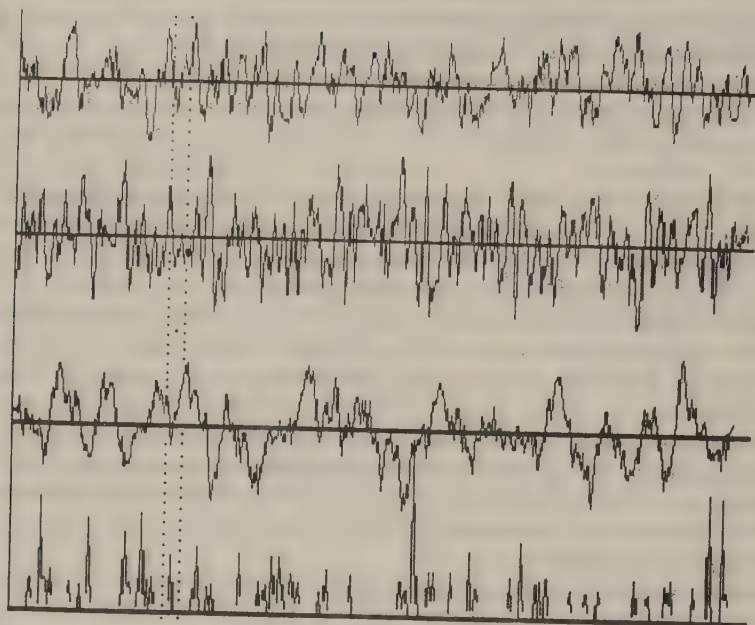
Durch SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese wurde ein 500 Dalton größeres, apparentes Molekulargewicht bestimmt. Der Austausch von Glycin durch Alanin führt allerdings nicht zu einer signifikanten Erhöhung des Molekulargewichtes, so daß man das unterschiedliche Laufverhalten auf SDS-Gelen anders erklären muß. Das zur Zeit anerkannte Modell über die Wechselwirkungen zwischen SDS und Proteinen wurde von REYNOLDS & TANFORD (1970) aufgrund hydrodynamischer Messungen aufgestellt. Das Modell besagt, daß durch die Einwirkung von SDS die Proteinmoleküle linearisiert werden und sich die SDS-Moleküle mit ihren hydrophoben Schwänzen um die Polypeptidkette legen. Es entstehen einheitliche, stäbchenförmige Partikel von 3,6 nm Durchmesser, bei denen nur die negativ-geladenen Sulfatreste des SDS nach außen zeigen. Das Laufverhalten dieser Partikel ist in Polyarylamidgelen nur von ihrer Länge abhängig. IBEL und Mitarbeiter konnten mit Hilfe von Neutronenstreuungsexperimenten an SDS-Protein-Komplexen zeigen, daß das aufgestellte Modell in dieser absoluten Form nicht immer zutrifft (IBEL, persönliche Mitteilung). Die Untersuchungen zeigten, daß bestimmte Peptidabschnitte nur partiell entfaltet werden. Es kann in Proteinen mit gleicher Länge durchaus aufgrund der unterschiedlicher Entfaltung der Peptidketten zu einer unterschiedlichen Beladung mit SDS-Molekülen kommen. Damit ist das Laufverhalten dieser Partikel nicht mehr ausschließlich von der Länge der Polypeptidkette abhängig. Auch das unterschiedliche Laufverhalten der beiden EPSP-Synthasen muß auf eine unterschiedliche Beladung mit SDS-Molekülen zurückgeführt werden. Voraussetzung dafür ist aber, daß sich die dreidimensionalen Strukturen der beiden Enzyme voneinander unterscheiden.

Weitere Unterschiede wurden bei der Bestimmung der Isoelektrischen Punkte festgestellt. Das Glyphosat-insensitive Enzym war saurer ($pI=4,1$) als das Glyphosat-sensitive Enzym ($pI=4,6$). Der Austausch von Glycin durch Alanin bewirkt keine Ladungsänderung im Gesamtprotein. Deshalb kann die Veränderung der Nettoaußenladung nur durch eine Änderung in der dreidimensionalen Struktur erklärt werden.

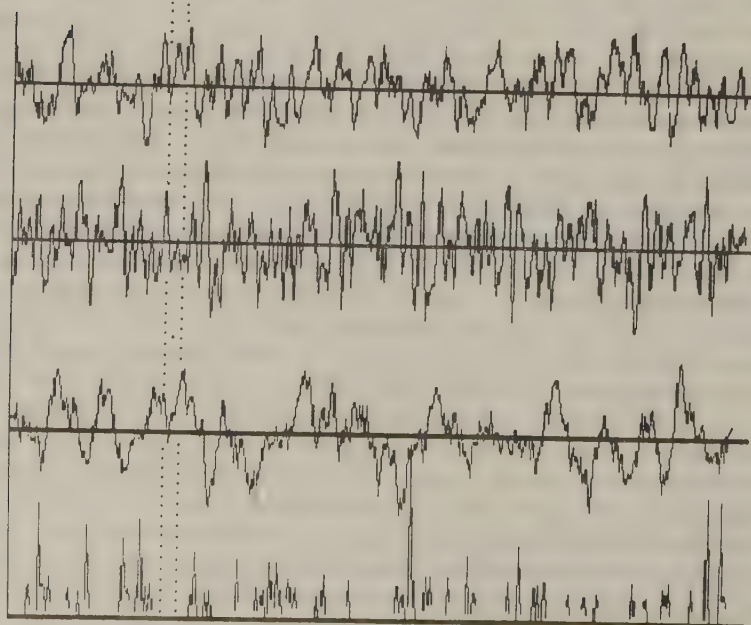
Um weitere Evidenzen dafür zu sammeln, daß die Mutation zu einer Konformationsänderung in der EPSP-Synthase geführt hat, wurde eine Sekundärstrukturanalyse der beiden Aminosäuresequenzen durchgeführt (Abb.15). Die Berechnungen, basierend auf der Auswertung der Röntgenstruktur von 29 Proteinen (CHOU & FASMAN, 1978), sagen für den Bereich um Gly-96 die Ausbildung einer Drehung voraus. Der Austausch gegen Alanin führt zu einem Wegfall der Drehung und zu einer Ausbildung eines größeren α -helicalen Bereiches. Da die Wahrscheinlichkeit für die korrekte Strukturvorhersage nicht bei 100% liegt, ist das errechnete Modell natürlich für sich alleine genommen noch kein Beweis für einen Konformationsunterschied. In Verbindung mit den proteinbiochemischen Daten liefert die Strukturvorhersage aber starke Hinweise auf Unterschiede in den dreidimensionalen Strukturen der beiden EPSP-Synthasen.

Abb.15: Sekundärstrukturanalyse der Aminosäuresequenzen der Glyphosat-sensitiven (wt) und -insensitiven (K1) EPSP-Synthase. Der Bereich um die Aminosäure 96 ist durch Punkte hervorgehoben. Dargestellt ist jeweils die über 4 Aminosäuren gemittelte Wahrscheinlichkeit für das Auftreten von α -Helices (1. Reihe), β -Faltblatt-Strukturen (2. Reihe) und Drehungen (4. Reihe) (CHOU & FASMAN, 1978). In der 3. Reihe ist jeweils das Hydropathie-Profil, gemittelt über 9 Aminosäuren, dargestellt (KYTE & DOOLITTLE, 1982).

wt



K1



5. Allgemeine Überlegungen zu Erzeugung Glyphosat-resistenter Pflanzen

Wie bereits erwähnt, wurden in den letzten Jahren Untersuchungen an Herbizid-resistenten Organismen in erster Linie im Hinblick auf die Erzeugung Herbizid-resistenter Nutzpflanzen durchgeführt. Auch für Glyphosat bestehen Überlegungen, resistente Nutzpflanzen zu erzeugen, um damit einen selektiven Einsatz dieses Herbizids zu ermöglichen. Eine stabile Resistenz kann generell nur durch genetische Veränderungen erreicht werden. Dabei stehen die Techniken der klassischen Pflanzenzüchtung, der modernen Pflanzenphysiologie und neuerdings auch der Molekularbiologie zur Verfügung.

Obwohl eine spontan auftretende Resistenz nach wiederholter Anwendung von Herbiziden in der Landwirtschaft häufig beobachtet wird (GRESSEL et al., 1982), stehen diese Pflanzen nur in Ausnahmefällen der klassischen Resistenzzüchtung zur Verfügung. So gelang es, Triazinresistenz durch Kreuzung mit einer nahe verwandten Wildart auf Raps zu übertragen (FAULKNER, 1982).

Bei weiter entfernten, nicht kreuzbaren Arten besteht die Möglichkeit, aus resistenten Pflanzen Protoplasten zu isolieren, diese mit Protoplasten anderer Pflanzen zu fusionieren und die Fusionsprodukte zu regenerieren. So gelang die Fusion von Triazin-resistenten Protoplasten aus *Solanum nigrum* mit Protoplasten von *Solanum tuberosum* und die anschließende Regeneration Triazin-resistenter Pflanzen (BINDING et al., 1982; GRESSEL et al., 1984). Alternativ besteht die Möglichkeit, aus pflanzlichen Zellkulturen resistente Zelllinien zu selektieren und diese zu regenerieren. Auf diese Weise konnten Sulfonylharnstoff-resistente Tabakpflanzen erzeugt werden (CHALEFF & RAY, 1984). Die dargestellten, pflanzenphysiologischen Techniken sind allerdings abhängig von der Regenerierbarkeit der *in vitro* kultivierten Zellen. Deshalb lassen sie sich fast ausschließlich auf Arten aus der Familie der *Solanaceae* anwenden.

Für die Erzeugung von Glyphosatresistenz bieten sich diese Techniken aber kaum an. Es existieren weder Glyphosat-resistente Pflanzen, die für eine Kreuzung zur Verfügung stehen, noch scheint es erfolgversprechend, Glyphosat-tolerante Zellkulturen zu regenerieren. Die Schwierigkeiten bei der Regenerierbarkeit konnten bisher erst einmal überwunden werden (DYER et al., 1988). Die regenerierten Pflanzen tolerierten zwar eine Behandlung mit Glyphosat, die normalerweise letal ist, zeigten aber ein deutlich verzögertes Wachstum.

Deshalb wird es auf lange Sicht wohl nur mit Hilfe der Gentechnologie möglich sein, Glyphosat-resistente Nutzpflanzen zu erzeugen. Diese Methode erscheint aus zwei Gründen erfolgversprechend:

Erstens kann durch die Veränderung eines einzigen Gens die Resistenz vermittelt werden. In der vorliegenden Arbeit konnte am Beispiel des *Klebsiella*

pneumoniae Stammes K1 gezeigt werden, daß eine Veränderung der *aroA*-Gensequenz ausreicht, um einen Glyphosat-resistenten Phänotyp zu erzeugen. Zweitens kann durch die Übertragung eines einzigen Gens die Resistenz vermittelt werden. In der vorliegenden Arbeit wurden die *aroA*-Gene aus *Klebsiella pneumoniae* wt und K1 in *E.coli* übertragen. Die transformierten Zellen zeigten Glyphosatresistenz.

Für die Einführung von genetischem Material in Pflanzenzellen ist eine Reihe von Techniken entwickelt worden. Es besteht die Möglichkeit der direkten DNA-Aufnahme (PASZKOWSKI et al., 1984), der Mikroinjektion (CROSSWAY et al., 1986) oder der Verwendung viraler Vektoren (GRONENBORN et al., 1984). Die einfachste und bislang erfolgreichste Methode beruht auf der Verwendung des natürlichen Gen-Vektor-Systems von *Agrobacterium tumefaciens* (CAPLAN et al., 1983).

Mit Hilfe des *Agrobacterium*-Systems wurde auch das *aroA*-Gen des Glyphosat-toleranten *Salmonella typhimurium* Stammes auf Tabak und Tomate übertragen (COMAI et al., 1985; FILLATTI et al., 1987). Die transformierten Pflanzen zeigten nur geringe Glyphosattoleranz. Als Ursache muß zum einen die geringe Toleranz der eingebrachten EPSP-Synthase angesehen werden. Zum anderen lag die EPSP-Synthase in den transformierten Pflanzen aber auch im falschen Kompartiment der Zelle, nämlich im Cytosol, vor.

Die logische Konsequenz der dargestellten Experimente ist, daß eine höhere Glyphosattoleranz bei Pflanzen nur dann erzielt werden kann, wenn es gelingt, eine Glyphosat-resistentere Form der EPSP-Synthase im Chloroplasten zu exprimieren. Eine EPSP-Synthase, die sich dafür anbieten würde, wäre das Enzym aus *K.pneumoniae* K1. Ein entsprechendes Experiment wurde mit einer Glyphosat-toleranten *E.coli* EPSP-Synthase durchgeführt. DELLA-CIOPPA et al. (1987) konnten zeigen, daß es mit Hilfe der Transitsequenz der *Petunia* EPSP-Synthase möglich ist, dieses Enzym in Chloroplasten von Tabakzellen einzubringen. Kalli der transformierten Zellen zeigten eine erhöhte Glyphosattoleranz (KISHORE & SHAH, 1988).

Sowohl die Glyphosat-resistente EPSP-Synthase aus *E.coli* wie das Enzym aus *K.pneumoniae* K1 zeigen eine niedrigere Affinität zu den Substraten, die mit einem langsameren Substratumsatz verbunden ist. (KISHORE et al., 1986; SOST et al., 1984). Darüber hinaus ist zumindest das Enzym aus *K.pneumoniae* instabiler als das vergleichbare Enzym des Wildtyps. Es ergibt sich daher die Frage, ob es nicht generell sinnvoller ist, natürlich vorkommende, Glyphosat-resistente EPSP-Synthasen in Pflanzen einzuführen. Solche Enzyme wurden bei einigen Arten der Gattung *Pseudomonas* gefunden (SCHULZ et al., 1985).

Die Lokalisierung der Mutation im *aroA*-Gen von *K.pneumoniae* eröffnet darüber hinaus eine weitere Möglichkeit, Glyphosat-resistente Nutzpflanzen zu erzeugen. Da die Mutation in einem stark konservierten Bereich der EPSP-Synthase liegt, ist es durchaus wahrscheinlich, daß eine *in vitro* induzierte Mutation an der entsprechenden Aminosäureposition der pflanzlichen EPSP-Synthase ebenfalls zu einer Glyphosatresistenz führt.

VI. Zusammenfassung

1. Das *aroA*-Gen aus *Klebsiella pneumoniae* Wildtyp, das für eine Glyphosat-sensitive 5-Enolpyruvylshikimisäure-3-Phosphat (EPSP) Synthase codiert, und das *aroA*-Gen aus einer Glyphosat-resistenten Mutante, das für eine Glyphosat-insensitive EPSP-Synthase codiert, wurden isoliert und sequenziert.
2. Es wurden Lambda-Genbanken der DNA aus beiden Bakterienstämmen angelegt. Die Identifizierung und Isolierung *aroA*-positiver Klone erfolgte über DNA-DNA-Hybridisierung mit dem *aroA*-Gen aus *Escherichia coli*. Aus ca. 2000 Klonen wurde für jede Genbank jeweils ein positiver Klon isoliert.
3. Von der DNA der isolierten Klone wurden Restriktionskarten erstellt. Zur Expression der EPSP-Synthase Aktivität wurden DNA-Fragmente in ein Plasmid umkloniert. Mit den Konstrukten wurde ein EPSP-Synthase defizienter *E.coli* Stamm transformiert. Die Transformanten konnten auf Minimalmedium wachsen und zeigten Toleranz gegenüber Glyphosat.
4. In den Rohextrakten der transformierten Stämme wurde die EPSP-Synthase Aktivität bestimmt. Es wurde eine erhöhte Enzymaktivität gemessen, auf die die Glyphosattoleranz zurückgeführt wurde. Die Aktivität der klonierten EPSP-Synthase aus dem Glyphosat-resistenten Mutantenstamm konnte durch Glyphosat nicht inhibiert werden.
5. Für das *aroA*-Gen des Wildtyps wurde ein DNA-Fragment mit einer Länge von 1565 Nukleotiden sequenziert. Es wurde ein offener Leserahmen mit einer Länge von 1284 Nukleotiden identifiziert, der 78% Homologie zum *aroA*-Gen aus *E.coli* aufwies. Aus der Nukleotidsequenz wurde die Aminosäuresequenz abgeleitet. Das *aroA*-Gen codiert für ein 427 Aminosäuren langes Protein mit einem Molekulargewicht von 45976 Dalton.
6. Die Nukleotidsequenz des *aroA*-Gens aus dem Glyphosat-resistenten *Klebsiella* Stamm wurde bestimmt und mit der Sequenz des Wildtypgens verglichen. Es wurde ein einziger Basenaustausch an Position 287 festgestellt. In der abgeleiteten Aminosäuresequenz führte diese Mutation zu einem Austausch von Glycin-96 durch Alanin. Es wurden Evidenzen dafür gesammelt, daß diese Mutation zu einer Veränderung der dreidimensionalen Struktur der EPSP-Synthase führt, wodurch die Bindungsaffinität zu Glyphosat drastisch verringert wird.
7. Durch den Vergleich der EPSP-Synthase Sequenz aus *K.pneumoniae* mit bereits bekannten Sequenzen aus Pilzen, Pflanzen und anderen Bakterien konnten streng konservierte Bereiche lokalisiert werden. Einem dieser Bereiche wurde eine funktionelle Bedeutung bei der Substratbindung zugewiesen.

Die Mutation, die zu einer Glyphosat-insensitiven EPSP-Synthase geführt hatte, wurde in einem weiteren konservierten Bereich lokalisiert. Diesem Bereich wurde eine Bedeutung bei der Bindung von Glyphosat zugewiesen. Es wurde die Hypothese aufgestellt, daß, in Analogie zu den Untersuchungen an Prokaryonten, eine Mutation in diesem Bereich bei pflanzlichen EPSP-Synthasen zu Glyphosat-resistenten Pflanzen führt.

8. Es wurde der Versuch unternommen, durch Kultur auf Glyphosat-haltigem Medium Glyphosat-resistente Pflanzen zu selektieren, die eine Glyphosat-insensitive EPSP-Synthase besitzen. Dazu wurden haploide Pflanzen aus Mikrosporen von *Nicotiana*-Arten angezogen. Darüber hinaus wurden aus haploidem Blattmaterial Zellsuspensions- und Protoplastenkulturen angelegt. In keinem Fall gelang es, eine Glyphosat-resistente Zelllinie zu selektieren.

VII. Literatur

- ABDEL-MEGUID, S.S., SMITH, W.W., BILD, G.S., 1985. Crystallization of 5-enol-pyruvylshikimate 3-phosphate synthase from *Escherichia coli*. J. Mol. Biol., **186**: 673.
- AMRHEIN, N., 1986. Specific inhibitors as probes into the biosynthesis and metabolism of aromatic amino acids. Rec. Adv. Phytochem., **20**: 83-117.
- AMRHEIN, N., HOLLÄNDER-CZYTKO, H., JOHÄNNING, D., SCHULZ, A., SMART, C.C., STEINRÜCKEN, H.C., 1987. Overproduction of 5-enolpyruvylshikimate 3-phosphate synthase in glyphosate-tolerant plant cell cultures. In: Plant Tissue and Cell Culture. Plant Biology, Vol.3. Grun, C.E., Somers, D.A., Hackett, W.P., Biesboer, D.D., (eds.). Alan R. Liss Inc., New York. pp. 119-134.
- ANDERSON, K.S., SIKORSKI, J.A., BENESI, A.J., JOHNSON, K.A., 1988. Isolation and structural elucidation of the tetrahedral intermediate in the EPSP synthase enzymatic pathway. J. Am. Chem. Soc., **110**: 6577-6579.
- ANTON, D.L., HEDSTROM, L., FISH, S.M., ABELES, R.H., 1983. Mechanism of enolpyruvyl shikimate 3-phosphate synthase exchange of phosphoenolpyruvate with solvent protons. Biochem., **22**: 5903-5908.
- ARBER, W. & LINN, S., 1969. DNA modification and restriction. Ann. Rev. Biochem., **38**: 467-500.
- BACHMANN, B.J. & LOW, K.B., 1980. Linkage map of *Escherichia coli* K-12, edition 6. Microbiol. Rev., **44**: 1-56.
- BAIRD, D.D., UPCHURCH, R.P., HOMESLEY, W.B., FRANZ, J.E., 1971. Introduction of a new broad spectrum postemergence herbicide class with utility for herbaceous perennial weed control. Proc. North Cent. Weed Cont. Conf., **26**: 64-68.
- BERK, A.J. & SHARP, P.A., 1977. Sizing and mapping of early adenovirus mRNAs by gel electrophoresis of S1 endonuclease-digested hybrids. Cell, **12**: 721-732.
- BEYNON, J., CANNON, M., BUCHANAN-WOLLASTON, V., CANNON, F., 1983. The *nif* promoters of *Klebsiella pneumoniae* have a characteristic primary structure. Cell, **34**: 665-671.

- BINDING, H., 1974. Regeneration von haploiden und diploiden Pflanzen aus Protoplasten von *Petunia hybrida* L.. Z. Pflanzenphysiol., **74**: 327-356.
- BINDING, H., 1975. Reproducible high plating efficiencies of isolated mesophyll protoplasts from shoot cultures of tobacco. Physiol. Plant., **35**: 225-227.
- BINDING, H., JAIN, S.M., FINGER, J., MORDHORST, G., NEHLS, R., GRESSEL, J., 1982. Somatic hybridization of a triazine resistant biotype of *Solanum nigrum* with *S.tuberosum*. I. Clonal variations in morphology and atrazine sensitivity. Theor. Appl. Genet., **63**: 273-277.
- BOLIVAR, F., RODRIGUEZ, R.L., GREENE, P.J., BETLACH, M.C., HEYNECKER, H. L., BOYER, H.W., 1977. Construction and characterization of new cloning vehicles. II. A multipurpose cloning system. Gene, **2**: 95-113.
- BRADFORD, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem., **72**: 248-254.
- BUVINGER, W.E. & RILEY, M., 1985. Nucleotide sequence of *Klebsiella pneumoniae lac* genes. J. Bacteriol., **163**: 850-857.
- CALOS, M.P. & MILLER, J.H., 1980. Transposable elements. Cell, **20**: 579-595.
- CAPLAN, A., HERRERA-ESTRELLA, L., INZE, D., VANHAUTE, E., VANMONTAGU, M., SCHELL, J., ZAMBRYSKI, P., 1983. Introduction of genetic material into plant cells. Science, **222**: 815-821.
- CASE, M.E. & GILES, N.H., 1971. Partial enzyme aggregates formed by pleiotropic mutants in the *arom* gene cluster of *Neurospora crassa*. Proc Natl. Acad. Sci. USA, **68**: 58-62.
- CHALEFF, R.S. & RAY, T.B., 1984. Herbicide-resistant mutants from tobacco cell cultures. Science, **223**: 1148-1151.
- CHARLES, I.G., KEYTE, J.W., BRAMMAR, W.J., SMITH, M., HAWKINS, A.R., 1986. The isolation and nucleotide sequence of the complex *arom* locus of *Aspergillus nidulans*. Nucl. Acids Res., **14**: 2201-2213.
- CHOU, P.Y. & FASMAN, G.D., 1978. Empirical predictions of protein conformation. Ann. Rev. Biochem., **47**: 251-276.
- CLARKE, L. & CARBON, J., 1976. A colony bank containing synthetic ColE1 hybrid plasmids representative of the entire *E.coli* genome. Cell, **9**: 91-99.

- CLEWELL, D.B. & HELINSKI, D.R., 1972. Effect of growth conditions on the formation of the relaxation complex of supercoiled ColE1 deoxyribonucleic acid and protein in *Escherichia coli*. J. Bacteriol., **110**: 1135-1146.
- COGGINS, J.R., BOOCOOCK, M.R., CAMPBELL, M.S., CHAUDHURI, S., LAMBERT, J.M., LEWENDON, A., MOUSDALE, D.M., SMITH, D.D.S., 1985. Functional domains involved in aromatic amino acid biosynthesis. Biochem. Soc. Trans., **13**: 299-303.
- COLE, D.J., DODGE, A.D., CASELEY, J.C., 1980. Some biochemical effects of glyphosate on plant meristems. J. Exp. Bot., **31**: 1665-1674.
- COMAI, L., FACCIOOTTI, D., HIATT, W.R., THOMPSON, G., ROSE, R.E., STALKER, D.M., 1985. Expression in plants of a mutant *aroA* gene from *Salmonella typhimurium* confers tolerance to glyphosate. Nature, **317**: 741-744.
- COMAI, L., SEN, L.C., STALKER, D.M., 1983. An altered *aroA* gene product confers resistance to the herbicide glyphosate. Science, **221**: 370-371.
- CROSSWAY, A., OAKES, J.V., IRVINE, J.M., WARD, B., KNAUF, V.C., SHEWMAKER, C.K., 1986. Integration of foreign DNA following microinjection of tobacco mesophyll protoplasts. Mol. Gen. Genet., **202**: 179-185.
- DELLA-CIOPPA, G., BAUER, S.C., KLEIN, B.K., SHAH, D.M., FRALEY, R.T., KISHORE, G.M., 1986. Translocation of the precursor of 5- enolpyruvyl-shikimate-3-phosphate synthase into chloroplasts of higher plants *in vitro*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **83**: 6873-6877.
- DELLA-CIOPPA, G., BAUER, S.C., TAYLOR, M.L., ROCHESTER, D.E., KLEIN, B.K., SHAH, D.M., FRALEY, R.T., KISHORE, G.M., 1987. Targeting a herbicide-resistant enzyme from *Escherichia coli* to chloroplasts of higher plants. Bio/Technology, **5**: 579-584.
- DUKE, S.O. & HOAGLAND, R.E., 1978. Effects of glyphosate on metabolism of phenolic compounds. I. Induction of phenylalanine ammonia-lyase activity in dark-grown maize roots. Plant Sci. Lett., **11**: 185-190.
- DUNCAN, K. & COGGINS, J.R., 1986. The *serC-aroA* operon of *Escherichia coli*. Biochem. J., **234**: 49-57.
- DUNCAN, K., EDWARDS, R.M., COGGINS, J.R., 1987. The pentafunctional *arom* enzyme of *Saccharomyces cerevisiae* is a mosaic of monofunctional domains. Biochem. J., **246**: 375-386.

- DUNCAN, K., LEWENDON, A., COGGINS, JR., 1984. The complete amino acid sequence of *Escherichia coli* 5-enolpyruvylshikimate 3-phosphate synthase. *FEBS Lett.*, **170**: 59-63.
- DYER, W.E., WELLER, S.C., BRESSAN, R.A., HERRMANN, K.M., 1988. Glyphosate tolerance in tobacco (*Nicotiana tabacum* L.). *Plant Physiol.*, **88**: 661-666.
- EVANS, D.A. & REED, S.M., 1981. Cytogenetic techniques. In: *Plant tissue culture. Methods and application in agriculture*. Thorpe, T.A., (ed.). Academic Press, New York. pp. 213-240.
- FAULKNER, J.S., 1982. Breeding herbicide-tolerant crop cultivars by conventional methods. In: *Herbicide resistance in plants*. LeBaron, H.M. & Gressel, J., (eds.). John Wiley, New York. pp. 234-256.
- FEDTKE, C., 1982. *Biochemistry and Physiology of herbicide action*. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.
- FILLATTI, J.J., KISER, J., ROSE, R., COMAI, L., 1987. Efficient transfer of a glyphosate tolerance gene into tomato using a binary *Agrobacterium tumefaciens* vector. *Bio/Technology*, **5**: 726-730.
- FRANZ, J.E., 1979. Glyphosate and related chemistry. In: *Advances in Pesticide Science*. Part 2. Geissbühler, H., (ed.). Pergamon Press, Oxford and New York. pp. 139-147.
- FRISCHAUF, A.M., LEHRACH, H., POUSTKA, A., MURRAY, N., 1983. Lambda replacement vectors carrying polylinker sequences. *J. Mol. Biol.*, **170**: 827-842.
- GAMBORG, O.L. & SHYLUK, J.P., 1981. Nutrition, media and characteristics of plant cell and tissue cultures. In: *Plant tissue culture. Methods and application in agriculture*. Thorpe, T.A., (ed.). Academic Press, New York. pp. 21-44.
- GASSER, C.S., WINTER, J.A., HIRONAKA, C.M., SHAH, D.M., 1988. Structure, expression, and evolution of the 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase genes of petunia and tomato. *J. Biol. Chem.*, **263**: 4280-4289.
- GILES, N.H., CASE, M.E., PARTRIDGE, C.W.H., AHMED, S.I., 1967. A gene cluster in *Neurospora crassa* coding for an aggregate of five aromatic synthetic enzymes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **58**: 1453-1460.

- GRESSEL, J., AMMON, H.U., FOGELFORS, H., GASQUEZ, J., KAY, Q.O.N., KEES, H., 1982. Discovery and distribution of herbicide-resistant weeds outside north america. In: Herbicide resistance in plants. LeBaron, H.M. & Gressel, J., (eds.). John Wiley, New York. pp. 31-55.
- GRESSEL, J., COHEN, N., BINDING, H., 1982. Somatic hybridization of an atrazine resistant biotype of *Solanum nigrum* with *S.tuberosum*. 2. Segregation of plastomes. Theor. Appl. Genet., **67**: 131-134.
- GRESSHOFF, P., 1979. Growth inhibition of glyphosate and reversal of its action by phenylalanine and tyrosine. Austr. J. Plant Physiol., **6**: 177-185.
- GRONENBORN, B., GARDNER, R.C., SCHAEFER, S., SHEPERD, R.J., 1981. Propagation of foreign DNA in plants using cauliflower mosaic virus as vector. Nature, **294**: 773-776.
- HANAHAN, D., 1985. Techniques for transformation of *E.coli*. In: DNA cloning. Vol. I. Glover, D.M., (ed.). IRL Press, Oxford, Washington DC. pp. 109-135.
- HARDIE, D.G. & COGGINS, J.R., 1986. Multifunctional proteins: Structure and evolution. Elsevier, Amsterdam.
- HAWLEY, D.K., McCURE, W.R., 1983. Compilation and analysis of *Escherichia coli* promoter DNA sequences. Nucl. Acids Res., **11**: 2237-2255.
- HOHN, B., 1979. *In vitro* packaging of lambda and cosmid DNA. In: Methods in Enzymology. Colowick, S.P., Kaplan, N.O., (eds.), Vol. **68**. Academic Press, New York. pp. 299-309.
- HOISETH, S.K. & STOCKER, B.A.D., 1985. Genes *aroA* and *serC* of *Salmonella typhimurium* constitute an operon. J. Bacteriol., **163**: 355-361.
- HOLLÄNDER-CZYTKO, H., JOHÄNNING, D., MEYER, H.E., AMRHEIN, N., 1988. Molecular basis for the overproduction of 5-enolpyruvylshikimate 3-phosphate synthase in a glyphosate-tolerant cell suspension culture of *Corydalis sempervirens*. Plant Molec. Biol., **11**: 215-220.
- HUYNH, Q.K., 1987. Reaction of 5-enol-pyruvylshikimate-3-phosphate synthase with diethyl pyrocarbonate: Evidence for an essential histidine residue. Arch. Biochem. Biophys., **258**: 233-239.
- HUYNH, Q.K., 1988. Evidence for a reactive gamma-carboxyl group (glu-418) at the herbicide glyphosate binding site of 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase from *Escherichia coli*. J. Biol. Chem., **263**: 11631-11635.

- HUYNH, Q.K., BAUER, S.C., BILD, G.S., KISHORE, G.M., BORGMEYER, J.R., 1988b. Site-directed mutagenesis of *Petunia hybrida* 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase: Lys-23 is essential for substrate binding. *J. Biol. Chem.*, **263**: 11636-11639.
- HUYNH, Q.K., KISHORE, G.M., BILD, G.S., 1988a. 5-Enolpyruvyl shikimate 3-phosphate synthase from *Escherichia coli*. Identification of Lys-22 as a potential active site residue. *J. Biol. Chem.*, **263**: 735-739.
- JOHANSSON, L., ANDERSSON, B., ERIKSSON, T., 1982. Improvement of anther culture technique: Activated charcoal bound in agar medium in combination with liquid medium and elevated CO₂ concentration. *Physiol. Plant.*, **54**: 24-30.
- KISHORE, G.M., BRUNDAGE, L., KOLK, K., PADGETTE, S.R., ROCHESTER, D., HUYNH, Q.K., DELLA-CIOPPA, G., 1986. Isolation, purification and characterization of a glyphosate tolerant *E.coli* EPSP synthase. *Fed. Proc. Am. Soc. Exp. Biol.*, **45**: 1506.
- KISHORE, G.M. & SHAH, D.M., 1988. Amino acid biosynthesis inhibitors as herbicides. *Ann. Rev. Biochem.*, **57**: 627-663.
- KLEE, H.J., MUSKOPF, Y.M., GASSER, C.S., 1987. Cloning of an *Arabidopsis thaliana* gene encoding 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase: Sequence analysis and manipulation to obtain glyphosate-tolerant plants. *Mol. Gen. Genet.*, **210**: 437-442.
- KLOOS, R., 1988. Modifikation der 5-Enolpyruvylshikimisäure-3-phosphate Synthase aus *Escherichia coli*. Diplomarbeit. Ruhr-Universität Bochum.
- KNIPPERS, R., 1982. Molekulare Genetik. Georg Thieme Verlag, Stuttgart. pp. 251-281.
- KORNBERG, A., 1980. DNA Replication. Freeman, W.H. and Company, San Francisco. pp. 139-142.
- KRÜPER, A., 1985. Bindung von Substraten und Inhibitoren an die 5-Enolpyruvylshikimisäure-3-Phosphat Synthase aus *Escherichia coli*. Diplomarbeit. Ruhr-Universität Bochum.
- KYTE, J. & DOOLITTLE, R.F., 1982. A simple method for displaying the hydrophobic character of a protein. *J. Mol. Biol.*, **157**: 105-132.

- LANZETTA, P.A., ALVAREZ, L.J., REINACH, P.S., CANDIA, O.A., 1979. An improved assay for nanomole amounts of inorganic phosphate. *Anal. Biochem.*, **100**: 95-97.
- LAIRD, A.J., RIBBONS, D.W., WOODROW, G.C., YOUNG, I.G., 1980. Bacteriophage Mu-mediated gene transposition and *in vitro* cloning of the enterochelin gene cluster of *Escherichia coli*. *Gene*, **11**: 347-357.
- LEVITT, G., PLOEG, H.L., WEIGEL, Jr., R.C., FITZGERALD, D.J., 1981. 2-Chloro-N ([4-methoxy-6-methyl-1,3,5,-triazin-2-yl]aminocarbonyl)-benzenesulfonamide, a new herbicide. *J. Agr. Food Chem.*, **29**: 416-424.
- LINSMAIER, E.M. & SKOOG, F., 1965. Organic growth factor requirements of tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.*, **19**: 110-127.
- LIPMAN, D.J., PEARSON, W.R., 1985. Rapid and sensitive protein similarity searches. *Science*, **227**: 1435-1441.
- MANIATIS, T., FRITSCH, E.F., SAMBROOK, J., 1982. Molecular cloning: A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory. Cold Spring Harbor, New York.
- MARGULIS, L., 1970. Origin of eukaryotic cells. Yale University Press, New Haven, CT.
- MASKELL, D.J., MORRISSEY, P., DOUGAN, G., 1988. Cloning and nucleotide sequence of the *aroA* gene of *Bordetella pertussis*. *J. Bacteriol.*, **170**: 2467-2471.
- MCCITRICK, J.C. & PIZER, L.I., 1980. Regulation of phosphoglycerate dehydrogenase levels and effect on serin synthesis in *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.*, **141**: 235-245.
- MELCHERS, G. & LABIB, G., 1970. Die Bedeutung haploider höherer Pflanzen für Pflanzenphysiologie und Pflanzenzüchtung. Die durch Antherenkultur erzeugten Haploiden, ein neuer Durchbruch für die Pflanzenzüchtung. *Ber. dtsh. Bot. Ges.*, **83**: 129-150.
- MESELSON, M. & YUAN, R., 1968. DNA restriction enzyme from *E.coli*. *Nature*, **217**: 1110-1114.
- MESSING, J., 1983. New M13 vectors for cloning. In: *Methods in Enzymology*. Colowick, S.P. & Kaplan, N.O., (eds.). Vol. **101**. Academic Press, New York. pp. 20-79.

- MESSING, J., CREA, R., SEEBURG, P.H., 1981. A system for shotgun DNA sequencing. *Nucleic Acids Res.*, **9**: 309-321.
- MIZUSAWA, S., NISHIMURA, S., SEELA, F., 1986. Improvement of the dideoxy chain termination method of DNA sequencing by use of deoxy-7-deazaguanosine triphosphate in place of dGTP. *Nucl. Acids Res.*, **14**: 1319-1324.
- MOUNT, D.W. & CONRAD, B., 1986. Improved programs for DNA and protein sequence analysis on the IBM personal computer and other standard computer systems. *Nucl. Acids Res.*, **14**: 443-454.
- MURASHIGE, T. & SKOOG, F., 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.*, **15**: 479-497.
- NEHLS-SAHABANDU, M., 1987. Modifizierung von Arginyl-Resten der 5-Enolpyruvylshikimisäure-3-Phosphat Synthase aus *Escherichia coli* durch Phenylglyoxal. Diplomarbeit. Ruhr-Universität Bochum.
- NITSCH, J.P. & NITSCH, C., 1969. Haploid plants from pollen grains. *Science*, **163**: 85-87.
- NORRANDER, J., KEMPE, T., MESSING, J., 1983. Construction of improved M13 vectors using oligodeoxynucleotide-directed mutagenesis. *Gene*, **26**: 101-106.
- PADGETTE, S.R., HUYNH, Q.K., AYKENT, S., SAMMONS, R.D., SIKORSKI, J.A., KISHORE, G.M., 1988b. Identification of the reactive cysteines of *Escherichia coli* 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase and their nonessentiality for enzymatic catalysis. *J. Biol. Chem.*, **263**: 1798-1802.
- PADGETTE, S.R., SMITH, C.E., HUYNH, Q.K., KISHORE, G.M., 1988a. Arginine chemical modification of *Petunia hybrida* 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase. *Arch. Biochem. Biophys.*, **266**: 254-262.
- PASZKOWSKI, J., SHILLITO, R.D., SAUL, M., MANDAK, U., HOHN, T., HOHN, B., POTRYKUS, I., 1984. Direct gene transfer to plants. *EMBO J.*, **3**: 2717-2722.
- PITTARD, J. & WALLACE, B.J., 1966. Distribution and function of genes concerned with aromatic biosynthesis in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, **91**: 1494-1508.

- REYNOLDS, J.A. & TANFORD, C., 1970. The gross conformation of protein-sodium dodecyl sulfate complexes. *J. Biol. Chem.*, **245**: 5161-5165.
- RINES, H.W., CASE, M.E., GILES, N.H., 1969. Mutants in the *aroM* gene cluster of *Neurospora crassa* specific for biosynthetic dehydroquinase. *Genetics*, **61**: 789-800.
- ROGERS, S.G., BRAND, L.A., HOLDER, S.B., SHARPS, E.S., BRACKIN, M.J., 1983. Amplification of the *aroA* gene from *Escherichia coli* results in tolerance to the herbicide glyphosate. *Appl. Environ. Microbiol.*, **46**: 37-43.
- ROSENBERG, H. & YOUNG, I.G., 1974. Iron transport in the enteric bacteria. In: *Microbial iron metabolism. A comprehensive treatise*. Neilands, J.B., (ed.). Academic Press, New York. pp. 67-81.
- ROSENBERG, M. & COURT, D., 1979. Regulatory sequences involved in the promotion and termination of RNA transcription. *Ann. Rev. Genet.*, **13**: 319-353.
- RUEPPEL, M.L., BRIGHTWELL, B.B., SCHAEFER, J., MARVEL, J.T., 1977. Metabolism and degradation of glyphosate in soil and water. *J. Agr. Food Chem.*, **25**: 517-528.
- RYAN, G.F., 1970. Resistance of common groundsel to simazine and atrazine. *Weed Sci.*, **18**: 614-616.
- SANGER, F., NICKLEN, S., COULSON, A.R., 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **74**: 5463-5467.
- SCHLOSS, J.V., CISKANIK, L.M., VANDYK, D.E., 1988. Origin of the herbicide binding site of acetolactate synthase. *Nature*, **331**: 360-362.
- SCHULZ, A., 1986. Biochemische Grundlagen der Glyphosatresistenz in Bakterien. Dissertation. Ruhr-Universität Bochum.
- SCHULZ, A., KRÜPER, A., AMRHEIN, N., 1985. Differential sensitivity of bacterial 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthases to the herbicide glyphosate. *FEMS Microbiol. Lett.*, **28**: 297-301.
- SCHULZ, A., SOST, D., AMRHEIN, N., 1984. Insensitivity of 5-enolpyruvylshikimate acid-3-phosphate synthase to glyphosate confers resistance to this herbicide in a strain of *Aerobacter aerogenes*. *Arch. Microbiol.*, **137**: 121-123.

- SCHULZ, A., SPÖNEMANN, P., KÖCHER, H., WENGENMAYER, F., 1988. The herbicidally active experimental compound Hoe 704 is a potent inhibitor of the enzyme acetolactate reductoisomerase. *FEBS Lett.*, **238**: 375-378.
- SHAH, D.M., HORSCH, R.B., KLEE, H.J., KISHORE, G.M., WINTER, J.A., TUMER, N.E., HIRONAKA, C.M., SANDERS, P.R., GASSER, C.S., AYKENT, S.A., SIEGEL, N.R., ROGERS, S.G., FRALEY, R.T., 1986. Engineering herbicide tolerance in transgenic plants. *Science*, **233**: 478-481.
- SHANER, D.L., ANDERSON, P.C., STIDHAM, M.A., 1984. Imidazolinones. Potent inhibitors of acetohydroxyacid synthase. *Plant Physiol.*, **76**: 545-546.
- SHAPIRO, H.A., 1970. Distribution of purines and pyrimidines in nucleic acids. In: *Handbook of biochemistry: Selected data for molecular biology*. 2nd ed., Sober, H.A., (ed.). CRC Press, West Palm Beach, Fla. pp. H83-H85.
- SHIH, M.C., LAZAR, G., GOODMAN, H.M., 1986. Evidence in favor of the symbiotic origin of chloroplasts: Primary structure and evolution of tobacco glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenases. *Cell*, **47**: 73-80.
- SHILLITO, R.D., PASZKOWSKI, J., POTRYKUS, I., 1983. Agarose plating and bead type culture technique enable and stimulate development of protoplast-derived colonies in a number of plant species. *Plant Cell Rep.*, **2**: 244-247.
- SILHAVY, T.J., BERMAN, M.L., ENQUIST, L.W., 1984. *Experiments with gene fusions*. Cold Spring Harbor, New York.
- SOST, D., 1984. Anreicherung und Charakterisierung einer Glyphosat-insensitiven 5-Enolpyruvylshikimisäure-3-Phosphat-Synthase aus einem Glyphosat-resistenten Stamm des Bakteriums *Klebsiella pneumoniae*. Diplomarbeit. Ruhr-Universität Bochum.
- SOST, D., SCHULZ, A., AMRHEIN, N., 1984. Characterisation of a glyphosate-insensitive 5-enolpyruvylshikimate acid-3-phosphat synthase. *FEBS Lett.*, **173**: 238-242.
- SOUTHERN, E.M., 1975. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.*, **98**: 503-517.
- STALKER, D.M., HIATT, W.R., COMAI, L., 1985. A single amino acid substitution in the enzyme 5-enolpyruvylshikimate 3-phosphate synthase confers resistance to the herbicide glyphosate. *J. Biol. Chem.*, **260**: 4724-4728.

- STEINRÜCKEN, H.C., 1982. Zur Wirkungsweise des Herbizids Glyphosat: Einfluß auf die 5-Enolpyruvylshikimisäure-3-phosphat Synthase aus *Aerobacter aerogenes* 62-1. Dissertation. Ruhr-Universität Bochum.
- STEINRÜCKEN, H.C. & AMRHEIN, N., 1980. The herbicide glyphosate is a potent inhibitor of 5-enolpyruvyl-shikimic acid-3-phosphate synthase. Biochem. Biophys. Res. Commun., **94**: 1207-1212.
- STEINRÜCKEN, H.C. & AMRHEIN, N., 1984a. 5-Enolpyruvylshikimate 3-phosphate synthase of *Klebsiella pneumoniae*. 1. Purification and properties. Eur. J. Biochem. **143**: 341-349.
- STEINRÜCKEN, H.C. & AMRHEIN, N., 1984b. 5-Enolpyruvylshikimate 3-phosphate synthase of *Klebsiella pneumoniae*. 2. Inhibition by glyphosate (N-[phosphonomethyl]glycine). Eur. J. Biochem. **143**: 351-357.
- TABOR, S. & RICHARDSON, C.C., 1987. DNA sequence analysis with a modified bacteriophage T7 DNA polymerase. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **84**: 4767-4771.
- THOMAS, C.A., BERNS, K.J., KELLY, T.J., 1966. Isolation of high molecular weight DNA from bacteria and cell nuclei. In: Procedures in Nucleic Acid Research. Cantoni, G.L. & Davies, D.R., (eds.). pp. 535-540.
- TREFFER, U., 1987. Inaktivierung der 5-Enolpyruvylshikimisäure-3-Phosphat Synthase aus *Escherichia coli* durch Pyridoxal 5-Phosphat: Identifizierung der Bindungsstelle. Diplomarbeit. Ruhr-Universität Bochum.
- TRIBE, D.E., CAMAKARIS, H., PITTARD, J., 1976. Constitutive and repressible enzymes of the common pathway of aromatic biosynthesis in *Escherichia coli* K-12: Regulation of enzyme synthesis at different growth rates. J. Bacteriol., **127**: 1085-1097.
- VASIL, I.K. & NITSCH, C., 1975. Experimental production of pollen haploids and their uses. Z. Pflanzenphysiol., **76**: 191-212.
- WEEDEN, N.F., 1981. Genetic and biochemical implications of the endosymbiotic origin of the chloroplast. J. Mol. Evol., **17**: 133-139.
- WOOD, W.B., 1966. Host specificity of DNA produced by *Escherichia coli*: Bacterial mutations affecting the restriction and modification of DNA. J. Mol. Biol., **16**: 118-133.

An diese Stelle möchte ich allen Mitarbeitern des Lehrstuhls für Pflanzenphysiologie der Ruhr-Universität Bochum für das angenehme Arbeitsklima danken.

Herrn Prof. Dr. U. Kück danke ich für Tips beim Anlegen der Lambda-Genbanken, Frau F. Kretschmar für die Einführung in die Technik der DNA-Sequenzierung und Herrn H. Winking für die Anfertigung der Photos und Zeichnungen.

Mein Dank gilt weiterhin den Herren Dr. J.D. Schwenn, F. Krone und C. Majewski für die Zusammenarbeit bei der P1 Transduktion sowie für ihre Diskussionsbereitschaft.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. E. Weiler, der es mir durch die Bereitstellung eines Arbeitsplatzes in den letzten Monaten ermöglichte, die vorliegende Arbeit fertigzustellen.

Mein persönlicher Dank gilt Herrn Prof. Dr. N. Amrhein für die Überlassung des Themas, sein Interesse am Fortgang der Arbeit sowie die Freiheiten bei der Durchführung der Experimente.

Lebenslauf

- | | |
|-----------|---|
| 13.5.1960 | geboren in Wuppertal |
| 1966-1969 | Grundschule in Wuppertal |
| 1969-1978 | Gymnasium in Wuppertal,
allgemeine Hochschulreife am 12.6.1978 |
| 1978-1984 | Studium Biologie/Diplom an der Ruhr-Universität Bochum,
Abschluß am 2.3.1984 mit dem akademischen Grad
Diplom-Biologe |
| 1984-1988 | wissenschaftlicher Mitarbeiter am Lehrstuhl für
Pflanzenphysiologie und Anfertigung der Dissertation
unter Anleitung von Prof. Dr. N. Amrhein |

